

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043599**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.05

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
201992027

(22) Дата подачи заявки
2018.03.06

(54) **ВОДНЫЙ СОСТАВ АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЙ АВЕЛУМАБ (ВАРИАНТЫ), СОСТАВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ, И ФЛАКОН, СОДЕРЖАЩИЙ УКАЗАННЫЙ СОСТАВ, ПРИМЕНЕНИЕ УКАЗАННОГО СОСТАВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **17159354.4**

(32) **2017.03.06**

(33) **EP**

(43) **2020.02.25**

(86) **PCT/EP2018/055404**

(87) **WO 2018/162446 2018.09.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE);
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Ринальди Джанлука,
Фратарканджели Сильвия, Шопик
Майкл Джеймс, Дель Рио Алессандра
(IT)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2013079174**

WO-A1-2015048520

WO-A1-2012135408

WO-A1-2016200835

**DAUGHERTY ANN L ET AL.: "CHAPTER
8: Formulation and delivery issues for monoclonal
antibody therapeutics", CURRENT TRENDS IN
MONOCLONAL ANTIBODY DEVELOPMENT
AND MANUFACTURE, SPRINGER, US, 1 January
2010 (2010-01-01), pages 103-129, XP009180430,
ISBN: 978-0-387-76642-3 page 107, paragraph 2
WO-A1-2017097407**

(57) Изобретение относится к вариантам нового водного фармацевтического состава антитела, содержащего авелумаб. Изобретение также относится к составу, предназначенному для внутривенного введения, и флакону, содержащему указанный состав. Также изобретение относится к применению указанного состава для лечения рака.

B1

043599

043599

B1

Изобретение относится к вариантам нового водного фармацевтического состава антитела, содержащего авелумаб. Настоящее изобретение также относится к составу, предназначенному для внутривенного введения и флакону, содержащие, указанный состав. Также настоящее изобретение относится к применению, указанного состава для лечения рака.

Предпосылки создания изобретения

Рецептор запрограммированной смерти 1 (PD-1) и лиганды 1 и 2 PD-1 (PD-L1, PD-L2) играют важную роль в иммунной регуляции. Экспрессируемый на активированных Т-клетках, PD-1 активируется посредством PD-L1 и PD-L2, экспрессируемых стромальными клетками, опухолевыми клетками или обоими видами клеток, инициируя Т-клеточную смерть и локализованную иммунную супрессию (Dong H, Zhu Г, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5:1365-69; Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, и др. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192:1027-34; Dong H, Strome SE, Salomao DR, и др. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8:793-800. Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039; Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24:207-12), потенциально обеспечивая иммуно-толерантную среду для развития и роста опухоли. И наоборот, ингибирование этого взаимодействия может усиливать локальные ответные реакции Т-клеток и опосредовать противоопухолевую активность на неклинических моделях животных (Dong H, Strome SE, Salomao DR, и др. *Nat Med* 2002; 8:793-800. Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039; Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, и др. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12293-97). В клинических условиях сообщалось, что лечение антителами, которые блокируют взаимодействие PD-1 - PD-L1, дает объективные показатели ответных реакций от 7 до 38% у пациентов с запущенными или метастатическими солидными опухолями с приемлемыми профилями безопасности (Hamid O, Robert C, Daud A, и др. Safety and tumor responses with lambrolizumab (Anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44; Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, и др. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-65; Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, и др. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-54; Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, и др. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-67). Примечательно, что для большинства пациентов ответы оказались длительными, с продолжительностью в 1 год или более.

Авелумаб (также известный как MSB0010718C) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело иммуноглобулина (Ig) изотипа G1. Авелумаб селективно связывается с PD- и конкурентно блокирует его взаимодействие с PD-1.

По сравнению с антителами против PD-1, которые нацелены на Т-клетки, авелумаб нацелен на опухолевые клетки и поэтому ожидается, что он будет иметь меньше побочных эффектов, включая более низкий риск связанных с аутоиммунной безопасностью проблем, так как блокада PD-L1 оставляет путь PD-L2 -PD-1 интактным, способствуя периферической аутоотолерантности (Latchman Y, Wood CR, Chernova T, и др. PD-L1 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261-68).

В настоящее время авелумаб тестируют в клинических условиях для различных типов злокачественных новообразований, включая немелкоклеточный рак легких, уротелиальную карциному, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, рак желудка или гастроэзофагеального соединения, рак яичников и рак молочной железы.

Аминокислотные последовательности авелумаба и варианты последовательностей и их антигенсвязывающие фрагменты описаны в WO 2013079174, где антитело, имеющее аминокислотную последовательность авелумаба, обозначается как A09-246-2. Также описаны способы изготовления и некоторые применения в медицине.

Другие применения в медицине авелумаба описаны в WO 2016137985, WO 2016181348, WO 2016205277, PCT/US 2016/053939, заявке на патент США серийный № 62/423,358.

В разделе 2.4 заявки WO 2013079174 также описан водный состав человеческого антитела с аминокислотной последовательностью авелумаба. Этот состав содержит антитело в концентрации 10 мг/мл, метионин в качестве антиоксиданта и имеет pH 5,5. Составы авелумаба, не содержащие антиоксидант, описаны в PCT/EP 2016/002040.

Исследование состава для негликозилированного антитела против PD-L1 типа IgG1 описано в WO 2015048520, где для клинических исследований был выбран состав с pH 5,8.

Описание изобретения

Поскольку авелумаб обычно вводят пациенту путем внутривенной инфузии и, следовательно, его предоставляют в водной форме, то настоящее изобретение относится к другим водным составам, которые пригодны для стабилизации авелумаба с его посттрансляционными модификациями, и при более высоких концентрациях, по сравнению с описанным в WO 2013079174.

На фиг. 1a (SEQ ID NO:1) представлена полноразмерная последовательность тяжелой цепи авелумаба, как экспрессируется клетками CHO, используемыми в качестве организма-хозяина.

Тем не менее часто наблюдают, что во время продукции антитела С-концевой лизин (К) тяжелой цепи отщепляется. Расположенная в Fc-участке, эта модификация не оказывает влияние на связывание антитела с антигеном. Поэтому в некоторых вариантах осуществления С-концевой лизин (К) последовательности тяжелой цепи авелумаба отсутствует. Последовательность тяжелой цепи авелумаба без С-концевого лизина представлена на фиг. 1b (SEQ ID NO:2).

На фиг. 2 (SEQ ID NO:3) представлена полноразмерная последовательность легкой цепи авелумаба. Посттрансляционная модификация с высокой значимостью представляет собой гликозилирование.

Большинство из растворимых и мембранно-связанных белков, которые вырабатываются в эндоплазматическом ретикулуме эукариотических клеток, подвергаются гликозилированию, при котором ферменты, называемые гликозилтрансферазами, присоединяют одну или несколько сахарных единиц к специфическим сайтам гликозилирования белков. Наиболее часто точками присоединения являются группы NH₂ или OH, что приводит к N-связанному или O-связанному гликозилированию.

Это также относится к белкам, таким как антитела, которые продуцируются рекомбинантно в эукариотических клетках-хозяевах. Рекомбинантные антитела IgG содержат консервативный N-связанный сайт гликозилирования на определенном аспарагиновом остатке Fc-области в домене CH2. Существует много известных физиологических функций N-связанного гликозилирования в антителе, таких как влияние на его растворимость и стабильность, резистентность к протеазе, связывание с Fc-рецепторами, клеточный транспорт и циркулирующий период полувыведения *in vivo* (Hamm M. и др., *Pharmaceuticals* 2013, 6, 393-406). N-гликановые структуры антитела IgG представляют собой преимущественно структуры типа двухантенного комплекса, содержащие единицы b-D-N-ацетилглюкозамина (GlcNac), маннозы (Man) и часто галактозы (Gal) и фукозы (Fuc).

В авелумабе единственным сайтом гликозилирования является Asn300, расположенный в домене CH2 обеих тяжелых цепей. Подробности гликозилирования описаны в примере 1.

Поскольку гликозилирование оказывает влияние на растворимость и стабильность антитела, то рационально принимать этот параметр во внимание при разработке стабильного, фармацевтически пригодного состава антитела.

Неожиданно изобретателями настоящего изобретения было обнаружено, что можно стабилизировать авелумаб, полностью охарактеризованный его аминокислотной последовательностью и его посттрансляционными модификациями, в ряде водных составов без присутствия антиоксиданта, при значениях pH даже ниже 5,2.

Фигуры

- Фиг. 1a - последовательность тяжелой цепи авелумаба (SEQ ID NO:1);
- фиг. 1b - последовательность тяжелой цепи авелумаба, в которой отсутствует С-концевой К (SEQ ID NO:2);
- фиг. 2 - последовательность легкой цепи авелумаба (SEQ ID NO:3);
- фиг. 3 - вторичная структура авелумаба;
- фиг. 4 - 2АВ ЖХГВ-СЭЖХ хроматограмма гликанов авелумаба;
- фиг. 5 - нумерация пиков фиг. 4.

Определения

Если не указано иное, следующие термины, используемые в описании и формуле изобретения, имеют следующие значения, изложенные ниже.

Ссылки в настоящем изобретении на "авелумаб" включают антитело против PD-L1 типа IgG1, как определено в WO 2013079174 посредством его аминокислотной последовательности, и как определено в настоящем изобретении посредством его аминокислотной последовательности и посредством его посттрансляционных модификаций. Ссылки в настоящем изобретении на "авелумаб" могут включать биологические аналоги, которые, например, могут составлять по меньшей мере 75, соответственно по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 85, предпочтительно по меньшей мере 90, предпочтительно по меньшей мере 95, предпочтительно по меньшей мере 96, предпочтительно по меньшей мере 97, предпочтительно по меньшей мере 98 или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотными последовательностями, раскрытыми в WO 2013079174. Альтернативно или дополнительно ссылки в настоящем изобретении на "авелумаб" могут включать биологические аналоги, которые отличаются посттрансляционными модификациями, в особенности характером гликозилирования, описанным в настоящем изобретении.

Термин "биологический аналог" (также известный как биопрепараты) хорошо известен в данной области техники, и квалифицированный специалист может легко определить, когда вещество лекарственного средства будет рассматриваться как биологический аналог авелумаба. Термин "биологический аналог", как правило, применяют для описания последующих версий (обычно из другого источника) "инновационных биофармацевтических продуктов" ("биопрепараты", лекарственное вещество которых произведено живым организмом или происходит из живого организма, или с помощью метода рекомбинантной ДНК или контролируемой экспрессии генов), на которые ранее официально получили регистрационное удостоверение. Поскольку биопрепараты имеют высокую степень молекулярной сложности и в целом чувствительны к изменениям процессов изготовления (например, если для их получения ис-

пользуют различные клеточные линии), и поскольку последующие производители "второго эшелона", как правило, не имеют доступа ни к молекулярному клону разработчика, клеточному банку, ноу-хау относительно процесса ферментации и очистки, ни к самому активному веществу лекарственного средства (только к серийно производимому разработчиками лекарственному продукту), то любой "биоаналог" маловероятно будет точно таким же, как оригинальное лекарственное средство.

В настоящем изобретении термин "буфер" или "буферный раствор" относится обычно к водному раствору, содержащему смесь кислоты (как правило, слабой кислоты, например, уксусной кислоты, лимонной кислоты, имидазолиевой форме гистидина) и ее конъюгированного основания (например, ацетатной или цитратной соли, например, ацетат натрия, цитрат натрия или гистидин), или в качестве альтернативы смесь основания (как правило, слабого основания, например, гистидина) и его конъюгированной кислоты (например, протонированной соли гистидина). Значение pH "буферного раствора" будет изменяться очень незначительно при добавлении небольшого количества сильной кислоты или основания благодаря "буферному эффекту", обеспечиваемому "буферным агентом".

В настоящем изобретении "буферная система" содержит один или несколько буферных агентов и/или их конъюгатов с кислотой или основанием, и более предпочтительно содержит один или несколько буферных агентов) и их конъюгатов с кислотой или основанием, и наиболее предпочтительно содержит только один буферный агент и его конъюгат с кислотой или основанием. Если не указано иное, то любые концентрации, предусмотренные в настоящем изобретении по отношению к "буферной системе" (то есть, концентрация буфера) предпочтительно относится к комбинированной концентрации буферных агентов и/или их конъюгатов с кислотой или основанием. Другими словами, концентрации, предусмотренные в настоящем изобретении по отношению к "буферной системе", предпочтительно относятся к комбинированной концентрации всех соответствующих буферных веществ (то есть веществ в динамическом равновесии друг с другом, например, цитрат/лимонная кислота).

Как таковая, заданная концентрация гистидиновой буферной системы, как правило, относится к комбинированной концентрации гистидина и имидазолиевой формы гистидина. Тем не менее в случае гистидина, такие концентрации, как правило, легко рассчитать, исходя из входных величин гистидина или его соли. Общее значение pH композиции, содержащей соответствующую буферную систему, в основном, является отражением равновесной концентрации каждого из соответствующих буферных веществ (то есть баланса буферного агента(ов) к его конъюгату(ам) с кислотой или основанием).

В настоящем изобретении термин "буферный агент" относится к кислотному или щелочному компоненту (обычно слабой кислоте или слабому основанию) буфера или буферного раствора. Буферный агент помогает поддерживать значение pH данного раствора при или около заранее определенного значения, и буферные агенты обычно выбирают для дополнения заранее определенного значения. Предпочтительно буферный агент представляет собой единственное соединение, которое приводит к желаемому буферному эффекту, в особенности, если указанный буферный агент смешивают с (и предпочтительно способен к протонному обмену с) соответствующим количеством (в зависимости от заранее определенного желаемого значения pH) его соответствующего "кислотного/щелочного конъюгата" или если требуемое количество его соответствующего "кислотного/щелочного конъюгата" образуется *in situ* - этого можно достичь путем добавления сильной кислоты или основания до достижения требуемого значения pH. Например, в буферной системе с ацетатом натрия, представляет возможным начинать прежде всего с раствора ацетата натрия (щелочной), который затем подкисляют с помощью, например, соляной кислоты, или к раствору уксусной кислоты (кислотный), добавляют гидроксид натрия или ацетат натрия до достижения желаемого значения pH.

В основном, "стабилизатор" относится к компоненту, который облегчает поддержание структурной целостности биофармацевтического лекарственного средства, в особенности во время замораживания и/или лиофилизации, и/или хранения (в особенности, когда подвергается нагрузке). Этот стабилизирующий эффект может быть обусловлен различными причинами, хотя обычно такие стабилизаторы могут действовать как осмолиты, которые смягчают денатурацию белка. Как используют в настоящем изобретении, стабилизаторы могут представлять собой сахарные спирты (например, инозит, сорбит), дисахариды (например, сахарозу, мальтозу), моносахариды (например, декстрозу (D-глюкозу)), или формы аминокислоты лизин (например, моногидрохлорид лизина, ацетат или моногидрат), или соли (например, хлорид натрия).

Агенты, используемые в качестве буферных агентов, антиоксидантов или поверхностно-активных веществ в соответствии с изобретением, исключены из значения термина "стабилизаторы", как используют в настоящем изобретении, даже если они могут проявлять, среди прочего, стабилизирующую активность.

В настоящем изобретении термин "поверхностно-активное вещество" относится к поверхностно-активному агенту, предпочтительно неионному поверхностно-активному веществу. Примеры поверхностно-активных веществ, используемых в настоящем изобретении, включают полисорбат, например, полисорбат 80 (полиоксиэтилен (80) сорбитан моноолеат, также известный под торговой маркой Tween 80); полиоксильное касторовое масло, такое как касторовое масло полиоксил 35, полученное реакцией касторового масла с этиленоксидом в молярном соотношении 1:35, также известное под торговой маркой Kol-

liphog ELP; или Kollidon 12PF или 17PF, которые являются низкомолекулярными повидонами (поливинилпирролидонами), известными под номером CAS 9003-39-8 и имеющими немного разный молекулярный вес (12PF: 2000-3000 г/моль, 17PF: 7000-11000 г/моль).

Агенты, используемые в качестве буферных агентов, антиоксидантов или стабилизаторов в соответствии с изобретением, исключены из значения термина "поверхностно-активные вещества", как используют в настоящем изобретении, даже если они могут проявлять, среди прочего, поверхностно-активную активность.

В настоящем изобретении термин "стабильный", в целом, относится к физической стабильности, и/или химической стабильности и/или биологической стабильности компонента, типично активного или его композиции, во время консервирования/хранения.

В настоящем изобретении термин "антиоксидант" относится к агенту, способному предотвращать или снижать окисление биофармацевтического лекарственного средства для стабилизации в составе. Антиоксиданты включают поглотители свободных радикалов (например, аскорбиновую кислоту, ВНТ, сульфит натрия, п-аминобензойную кислоту, глутатион или пропилгаллат), хелатирующие агенты (например, EDTA или лимонную кислоту) или агенты обрыва цепи (например, метионин или N-ацетилцистеин).

Агенты, используемые в качестве буферных агентов, стабилизаторов или поверхностно-активных веществ в соответствии с изобретением, исключены из значения термина "антиоксиданты" как используют в настоящем изобретении, даже если они могут проявлять, среди прочего, антиоксидантную активность.

"Разбавитель" представляет собой агент, который устанавливает баланс ингредиентов в любой жидкой фармацевтической композиции, например, чтобы проценты по весу, в общем, составляли 100%. В настоящем изобретении, жидкая фармацевтическая композиция представляет собой водную фармацевтическую композицию, так что "разбавитель", используемый в настоящем изобретении представляет собой воду, преимущественно воду для инъекций (WFI).

В настоящем изобретении термин "размер частиц" или "размер пор" соответственно относится к длине наибольшего измерения данной частицы или поры. Оба размера могут быть измерены, используя лазерный анализатор размера частиц и/или электронные микроскопы (например, туннельный электронный микроскоп, ТЕМ или сканирующий электронный микроскоп, SEM). Количество частиц (для любого заданного размера) может быть получено с использованием протоколов и оборудования, изложенных в Примерах, которое относится к количеству частиц, невидимых невооружённым глазом.

В настоящем изобретении термин "приблизительно" относится к обычным границам погрешности для соответствующего значения, хорошо известным квалифицированному специалисту в данной области техники. Ссылка на "приблизительно" для значения или параметра в настоящем изобретении включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к значению или параметру *per se*. В случае сомнений или если в данной области техники отсутствует общепринятое понимание относительно границ погрешности для определенного значения или параметра, "приблизительно" обозначает $\pm 5\%$ от этого значения или параметра.

В настоящем изобретении термин "процентная доля" в связи с видами гликанов относится непосредственно к числу различных видов. Например, выражение "указанный FA2G1 имеет долю 25-41% всех видов гликанов" означает, что в 50 анализируемых молекулах антител, имеющих 100 тяжелых цепей, 25-41 тяжелых цепей будут проявлять профиль гликозилирования FA2G1.

Следует принять во внимание, что ссылки на понятия "лечение" или "терапия" включают профилактику, а также облегчение установленных симптомов состояния. Поэтому "лечение" или "терапия" статуса, нарушения или состояния включает: (1) предотвращение или замедление появления клинических симптомов статуса, нарушения или состояния, развивающегося у человека, который может страдать или быть предрасположен к статусу, нарушению или состоянию, но еще не ощущает или не проявляются клинические или субклинические симптомы статуса, нарушения или состояния, (2) ингибирование статуса, нарушения или состояния, то есть ингибирование статуса, нарушения или состояния, то есть остановку, уменьшение или замедление развития заболевания или его рецидива (в случае поддерживающей терапии) или по меньшей мере его одного клинического или субклинического симптома или (3) облегчение или ослабление заболевания, то есть вызывая регресс статуса, вызывая регресс или по меньшей мере одного из его клинических или субклинических симптомов.

Водный состав антитела против PD-L1.

В первом аспекте в изобретении предлагается новый водный фармацевтический состав антитела, который содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
- (ii) глицин в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) моногидрохлорид лизина, декстрозу, сахарозу или сорбит в концентрации от 100 до 320 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) поливинилпирролидон под номером CAS 9003-39-8 (молекулярный вес: 2000-3000 г/моль), кас-

товое масло полиоксил 35 или полисорбат 80 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл, в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет рН от 3,8 до 4,6.

В более предпочтительном варианте осуществления новый водный фармацевтический состав антителя содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антителя;
- (ii) глицин в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации приблизительно 140 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет рН от 4,2 до 4,6.

В еще более предпочтительном варианте осуществления новый водный фармацевтический состав антителя содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антителя;
- (ii) глицин в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) ацетат лизина в концентрации приблизительно 140 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет рН от 4,2 до 4,6.

Равным образом в варианте осуществления новый водный фармацевтический состав антителя содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антителя;
- (ii) сукцинат в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) моногидрохлорид лизина, декстрозу, сахарозу или сорбит в концентрации от 100 до 320 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) поливинилпирролидон под номером CAS 9003-39-8 (молекулярный вес: 2000-3000 г/моль) или касторовое масло полиоксил 35 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл, в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет рН от 4,9 до 5,2.

Равным образом в предпочтительном варианте новый водный фармацевтический состав антителя содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антителя;
- (ii) сукцинат в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации приблизительно 140 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет рН от 4,8 до 5,2.

Равным образом в варианте осуществления новый водный фармацевтический состав антителя содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антителя;
- (ii) гистидин в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) моногидрохлорид лизина, декстрозу, сахарозу, инозит или сорбит в концентрации от 100 до 320 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) поливинилпирролидон под номером CAS 9003-39-8 (молекулярный вес: 2000-3000 г/моль) или касторовое масло полиоксил 35 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл, в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет рН от 4,8 до 5,2.

Равным образом в предпочтительном варианте новый водный фармацевтический состав антителя содержит:

- (i) авелумаб в концентрации от 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл в качестве антителя;
- (ii) гистидин в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) сахарозу в концентрации приблизительно 280 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;

(iv) Kolliphor ELP в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества; где состав имеет pH от 4,8 до 5,2.

В более предпочтительном варианте осуществления описанных выше вариантов осуществления, концентрация авелумаба составляет приблизительно 20 мг/мл.

В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный состав включает в себя:

- (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) глицин в концентрации 10 мМ;
- (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации 140 мМ;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации 0,5 мг/мл;
- (v) HCl или NaOH для регулирования pH;
- (vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

и имеет pH 4,4 ($\pm 0,1$);

или (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(ii) глицин в концентрации 10 мМ;

(iii) ацетат лизина в концентрации 140 мМ;

(iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации 0,5 мг/мл;

(v) HCl или NaOH для регулирования pH;

(vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

и имеет pH 4,4 ($\pm 0,1$);

или (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(ii) гистидин в концентрации 10 мМ;

(iii) сахарозу в концентрации 280 мМ;

(iv) Kolliphor ELP в концентрации 0,5 мг/мл;

(v) HCl или NaOH для регулирования pH;

(vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

и имеет pH 5,0 ($\pm 0,1$);

или (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(ii) сукцинат в концентрации 10 мМ;

(iii) моногидрохлорид лизина в концентрации 140 мМ;

(iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации 0,5 мг/мл;

(v) HCl или NaOH для регулирования pH;

(vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

и имеет pH 5,0 ($\pm 0,1$).

В другом предпочтительном варианте осуществления, состав имеет осмоляльность между 270 и 330 мОсм/кг.

В одном варианте осуществления указанный авелумаб в описанных выше составах имеет последовательность тяжелой цепи или фиг. 1a (SEQ ID NO:1) или фиг. 1b (SEQ ID NO:2), последовательность легкой цепи фиг. 2 (SEQ ID NO:3), и несет гликозилирование на Asn300, который содержит FA2 и FA2G1 в качестве основных видов гликанов, имеющих общую долю >70% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления, в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет долю 44-54% и указанный FA2G1 имеет долю 25-41% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет долю 47-52% и указанный FA2G1 имеет долю 29-37% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления, в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет долю приблизительно 49% и указанный FA2G1 имеет долю приблизительно 30% - приблизительно 35% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления гликозилирование авелумаба кроме того, в качестве второстепенного вида гликана содержит A2 с долей <5%, A2G1 с долей <5%, A2G2 с долей <5% и FA2G2 с долей <7% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления, в гликозилировании авелумаба указанный A2 имеет долю 3-5%, указанный A2G1 имеет долю <4%, указанный A2G2 имеет долю <3%, а указанный FA2G2 имеет долю 5-6% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления, в гликозилировании авелумаба указанный A2 имеет долю приблизительно 3,5% - приблизительно 4,5%, указанный A2G1 имеет долю приблизительно 0,5% - приблизительно 3,5%, указанный A2G2 имеет долю <2,5% и указанный FA2G2 имеет долю приблизительно 5,5% всех видов гликанов.

В одном варианте осуществления указанный авелумаб в описанном выше составе имеет последовательность тяжелой цепи с фиг. 1b (SEQ ID NO:2).

В одном варианте осуществления описанный выше состав авелумаба предназначен для внутривенного введения (в.в.).

Устройство для доставки лекарственного средства.

Во втором аспекте в настоящем изобретении предлагается устройство, а именно флакон для доставки лекарственного средства, которые содержит, описанный выше состав. Предпочтительно устройство для доставки лекарственного средства содержит камеру, в которой хранится, описанный выше состав. Предпочтительно устройство для доставки лекарственного средства является стерильным. Предпочтительно устройство, представляет собой стеклянный флакон.

Устройство для доставки лекарственного средства может представлять собой, помимо флакона, ампулу, шприц, инъекционную ручку (например, по существу, включающую шприц), или в/в (внутривенный) контейнер.

Водные фармацевтические составы вводят парентерально, преимущественно путем подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, в/в инъекции или в/в инфузии. Наиболее предпочтительным путем введения является в/в инфузия.

В более предпочтительном варианте осуществления указанный флакон содержит 200 мг авелумаба в 10 мл раствора для концентрации 20 мг/мл.

Медицинское лечение.

В третьем аспекте в изобретении предложено применение, указанного выше состава для лечения рака.

В одном варианте осуществления подлежащий лечению рак выбирают из немелкоклеточного рака легких, уротелиальной карциномы, рака мочевого пузыря, мезотелиомы, карциномы из клеток Меркеля, рака желудка или гастроэзофагеального соединения, рака яичников, рака молочной железы, тимомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы, плоскоклеточного рака головы и шеи, почечно-клеточной карциномы, меланомы и/или классической лимфомы Ходжкина.

Способы изготовления.

Состав, указанный выше может быть изготовлен, предпочтительно способом, который включает в себя совместное смешивание, в любом конкретном порядке, который считают целесообразным, любых соответствующих компонентов, необходимых для образования водного фармацевтического состава. Специалист в данной области техники может сослаться на примеры или методики, хорошо известные из уровня техники для образования водных фармацевтических составов (в особенности предназначенных для инъекций с помощью шприца или в/в инфузии).

Способ может включать в себя сначала приготовление предварительной смеси (или предварительного раствора) из некоторых или всех компонентов (по выбору с некоторым или всем разбавителем), за исключением авелумаба, а затем и сам авелумаб (по выбору с или предварительно растворенным в некотором количестве разбавителя) можно смешать с предварительной смесью (или предварительным раствором) для получения водного фармацевтического состава или композиции, к которому/которой затем добавляют конечные компоненты, чтобы получить конечный водный фармацевтический состав. Преимущественно, способ включает образование буферной системы, предпочтительно буферной системы, которая содержит буферный агент, как описано в настоящем изобретении. Буферная система предпочтительно образуется в предварительной смеси перед добавлением авелумаба. Буферная система может быть образована путем простого смешивания буферного агента (поставляется готовым к применению) с его кислотным/щелочным конъюгатом (предпочтительно в соответствующих относительных количествах для обеспечения желаемого pH - это может быть определено квалифицированным специалистом или теоретически, или экспериментально). В случае ацетатной буферной системы это означает, например, смешивание ацетата натрия с HCl, или смешивание уксусной кислоты с NaOH или ацетатом. Значение pH любой предварительной смеси конечного водного фармацевтического состава может быть целесообразно отрегулировано путем добавления требуемого количества основания или кислоты, или количества буферного агента или кислотного/щелочного конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент и/или буферную систему предварительно образуют в виде отдельной смеси и буферную систему переносят к предшественнику водного фармацевтического состава (который содержит некоторые или все компоненты, не считая буферного агента и/или буферной системы, предпочтительно содержащих авелумаб и потенциально только авелумаб) посредством замены буфера (например, используя диафильтрацию до достижения соответствующих концентраций или осмолярности). После этого, при необходимости, могут быть добавлены другие наполнители, чтобы получить конечную жидкую фармацевтическую композицию. Значение pH может быть отрегулировано один раз или до того, как будут присутствовать все компоненты.

Перед смешиванием с другими компонентами любой, некоторые или все компоненты могут быть предварительно растворены или предварительно смешаны с разбавителем.

Конечный водный фармацевтический состав можно отфильтровать, предпочтительно для удаления взвешенных частиц. Предпочтительно фильтрацию осуществляют через фильтры размером в или менее 1 мкм, предпочтительно в 0,22 мкм. Предпочтительно фильтрацию осуществляют с помощью фильтров PES или фильтров PVDF, предпочтительно посредством 0,22 мкм фильтров PES.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, можно использовать водный фармацевтический состав для приготовления в/в раствора, чтобы лекарственное вещество на основе антигена можно

было вводить внутривенно.

Приготовление в/в раствора обычно включает в себя некоторое количество раствора, которое было отобрано из контейнеров с физиологическим раствором (например, 0,9 или 0,45% физиологическим раствором) с помощью пластикового шприца (PP) и иглы, и заменено водным фармацевтическим составом. Заменяемое количество раствора будет зависеть от массы тела пациентов.

Сокращения

ANOVA - дисперсионный анализ;
 CD - круговой дихроизм;
 CE-SDS - капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия;
 cIEF - капиллярное изоэлектрофокусирование;
 DoE - план эксперимента;
 DP - лекарственный продукт;
 DS - лекарственное вещество;
 FT - замораживание-оттаивание;
 HMW - высокий молекулярный вес;
 LMW - низкий молекулярный вес;
 SE-HPLC - эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография;
 ОП - оптическая плотность;
 PES - полиэфирсульфон;
 PVDF - поливинилиденфторид;
 RH - относительная влажность;
 SE-HPLC - эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография;
 UV - ультрафиолет;
 WFI - вода для инъекций.

Примеры.

Пример 1. Структура авелумаба.

1.1. Первичная структура.

Авелумаб представляет собой IgG молекулы с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями. Аминокислотные последовательности двух цепей представлены на фиг. 1a (SEQ ID NO:1)/1b (SEQ ID NO:2) и соответственно 2 (SEQ ID NO:3).

1.2. Вторичная структура.

Методы ЖХ-МС и МС/МС использовали для подтверждения интактных цепей молекулы и присутствия посттрансляционных модификаций белков.

Вторичная структура субъединиц молекулы авелумаба представлены на фиг. 3.

Как подтверждено с помощью UPLC-Q-TOF масс-спектрометрии пептидов, полученных путем расщепления трипсином, дисульфидные связи Cys21-Cys96, Cys21-Cys90, Cys147-Cys203, Cys138-Cys197, Cys215-Cys223, Cys229-Cys229, Cys232-Cys232, Cys264-Cys324 и Cys370-Cys428 образуют девять типичных IgG моделей связывания.

1.3. Гликозилирование.

Молекула содержит один сайт N-гликозилирования на Asn300 тяжелой цепи. Как определено с помощью картирования пептида, основная структура, идентифицированная путем MALDI-TOF, представляла собой сложный фукозилированный олигосахарид с ядром двухантенного типа с нулевым (G0F), одним (G1F) или двумя остатками галактозы (G2F). Основными видами являются G0F и G1F.

Гликаны авелумаба, флуоресцентно меченные с помощью 2-аминобензамида, анализировали с помощью HILIC-UPLC-ESI-Q-TOF. На фиг. 4 показан профиль UPLC обнаруженных видов гликанов.

Таблица 1

Идентификация пика хроматограммы 2AB HILIC-UPLC

Пик	RT (мин)	Измеренный MB	Ожидаемый MB	Идентификация	Оксфордская номенклатура	Идентификация путем
1a	5,99	1380,52 (M+H)	1380,54 (M+H)		FA1	Вручную идентифицирован путем MS
2	6,01	1437,54	1437,56		A2	Вручную идентифицирован путем MS
3	7,02	1583,74 (M+H)	1583,62 (M+H)		FA2	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
4	7,77	1355,57 (M+H)	1355,51 (M+H)		M5	Вручную идентифицирован путем MS
5	8,16	1599,77 (M+H)	1599,62 (M+H)		A2G1	Вручную идентифицирован путем MS
6	9,82	1744,79	1744,67		FA2G1	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
		1462,90	1462,54		FA2 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем MS
7	10,07	1744,80	1744,67		FA2G1	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
		1462,91	1462,54		FA2 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем MS
8	10,44	1462,90	1462,54		FA 2 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем MS
		1744,79	1744,67		FA2G1	Вручную идентифицирован путем MS
9	12,15	1177,50 (M+H)	1177,46 (M+H)		FM3	GlycoworkBench идентифицирован путем MS
10	16,66	Нет ионизации	Нет ионизации			
11	13,42	1906,33	1906,72		FA2G2	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
		1624,71	1624,59		FA2G1 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем MS
12	13,71	954,40 (M+2H)/2	954,36 (M+2H)/2		FA2G2	Вручную идентифицирован путем MS
		1626,69	1626,61		FA2G1 красный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем MS
13	17,46	1099,97 (M+2H)/2	1099,91 (M+2H)/2		FA2G2S	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
14	18,54	1079,91 (M+2H)/2	1079,86 (M+2H)/2		FA2G2S свободный Конец+S (возможно-небольшие следы)	Вручную идентифицирован путем MS
15	21,04	2489,05	2488,91		FA2G2S2	Вручную идентифицирован путем MS

Геометрические формы, представляющие гликановые связывающие блоки, соответствуют следующим молекулярным структурам:

● Man △ Fuc ○ Gal □ GalNAc ▨ GlcNAc ◇ NANA

Man: манноза, Fuc: фукоза, Gal: галактоза, GalNAc: N-ацетилгалактозамин, NANA: сиаловая кислота.

Используемая номенклатура гликанов соответствует Оксфордскому обозначению, как предложено у Harvey и др. (Proteomics 2009, 9, 3796-3801). В видах, содержащих фукозу (FA2, FA2G1, FA2G2), связность Fuc-GlcNAc представляет собой α 1-6. В видах, имеющих концевой GlcNAc, связность GlcNAc-Man представляет собой β 1-2. В видах, содержащих галактозу связность Gal-GlcNAc представляет собой β 1-4.

Описанный хроматографический профиль был интегрирован и дал распределение видов гликанов Авелумаба, как показано в табл. 2а.

Таблица 2а

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2	M5**
3.6	48.7	3.4	35.6	2.3	5.4	1.0

** Возможно манноза 5, совместная элюция с двухантенными моно-галактозилированными видами.

Анализ картирования гликанов подтвердил идентификацию, осуществленную путем картирования пептидов (что позволяет идентифицировать два основных вида гликанов), дополнительно к вторичным и второстепенным видам, которые также были охарактеризованы с помощью этого метода, специфического для анализа гликанов.

В другом измерении наблюдали распределение следующих видов гликанов.

Таблица 2б

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2
4.0	50.2	1.0	30.0	0.1	5.6

Пример 2. Скрининг DoE.

Скрининг плана эксперимента при 20 мг/мл авелумаба оценивал влияние нескольких факторов, таких как изменение типа буфера/pH, стабилизаторов, типа поверхностно-активного вещества и соответствующей концентрации. Исследование, в котором тестировали 80 различных составов, привело к выбору приемлемых условий, в которых можно максимизировать стабильность белка.

В этом DoE были исследованы четыре разных буфера, охватывающих разные типы буферов и эффективный диапазон буферизации pH:

аминокислотные буферы, такие как глицин (эффективное pH от 4,0 до 7,5) и гистидин (эффективное pH от 5,0 до 6,6);

хелатный ионный буфер, такой как цитрат (эффективное pH от 4,0 до 7,5);

сукцинат (эффективное pH от 5,0 до 6,0).

Семь стабилизаторов были выбраны в DoE на основе их химической структуры. В DoE были включены сахара, полиолы, соли и аминокислоты. Разбивка выглядит следующим образом:

Сахара: были выбраны дисахариды сахароза и мальтоза, а также моносахарид декстроза (D-глюкоза).

Сахарные спирты: для DoE были выбраны два сахарных спирта/полиола - сорбит и инозит.

Соль: хлорид натрия был исследован в качестве автономного стабилизатора в этом DoE.

Аминокислота: лизин, была исследована положительно заряженная аминокислота.

В табл. 3 перечислены образцы и их соответствующие композиции.

Таблица 3

Скрининг DoE составов

ИД образца	pH	Буфер	Буферная сила (мМ)	Стабилизатор (280 мМ)	ПАВ (0,5 мг/мл)
1	4	Цитрат-фосфат	10	Сорбит	Kollidon 12PF
2	4	Цитрат-фосфат	50	Декстроза	Tween 40
3	4.5	Цитрат-фосфат	20	Декстроза	Tween 40
4	4.5	Цитрат-фосфат	30	Инозит	Kollidon 12PF
5	4.8	Цитрат-фосфат	40	Мальтоза	Kolliphor ELP
6	4.8	Цитрат-фосфат	40	Лизин	Tween 80
7	5.2	Цитрат-фосфат	50	Декстроза	Kolliphor ELP
8	5.2	Цитрат-фосфат	10	Хлорид натрия	Tween 80
9	5.2	Цитрат-фосфат	20	Лизин	Kolliphor ELP
10	5.5	Цитрат-фосфат	20	Сахароза	Kollidon 12PF
11	5.5	Цитрат-фосфат	30	Лизин	Tween 40
12	6	Цитрат-фосфат	20	Мальтоза	Tween 40
13	6	Цитрат-фосфат	30	Хлорид натрия	Kolliphor ELP
14	6.5	Цитрат-фосфат	30	Декстроза	Tween 80

15	6.5	Цитрат-фосфат	30	Сорбит	Tween 80
16	7	Цитрат-фосфат	50	Сахароза	Tween 80
17	7	Цитрат-фосфат	10	Лизин	Kollidon 12PF
18	7	Цитрат-фосфат	10	Инозит	Tween 80
19	7	Цитрат-фосфат	30	Хлорид натрия	Tween 40
20	7.5	Цитрат-фосфат	50	Инозит	Kolliphor ELP
21	7.5	Цитрат-фосфат	50	Сорбит	Tween 40
22	4	Глицин	10	Хлорид натрия	Kollidon 12PF
23	4	Глицин	10	Декстроза	Tween 40
24	4	Глицин	30	Сорбит	Tween 40
25	4.3	Глицин	50	Сорбит	Kolliphor ELP
26	4.3	Глицин	50	Инозит	Tween 40
27	4.3	Глицин	50	Декстроза	Tween 80
28	4.5	Глицин	30	Хлорид натрия	Tween 40
29	4.8	Глицин	40	Лизин	Tween 80
30	4.8	Глицин	40	Мальтоза	Tween 80
31	5.8	Глицин	50	Лизин	Kollidon 12PF
32	5.8	Глицин	30	Мальтоза	Kollidon 12PF
33	6	Глицин	30	Сахароза	Kolliphor ELP
34	6.5	Глицин	30	Хлорид натрия	Tween 80
35	6.8	Глицин	40	Декстроза	Kolliphor ELP
36	6.8	Глицин	10	Инозит	Tween 80
37	6.8	Глицин	10	Сорбит	Kollidon 12PF
38	7	Глицин	10	Лизин	Kolliphor ELP
39	7	Глицин	10	Инозит	Tween 40
40	7	Глицин	30	Хлорид натрия	Tween 80
41	7.5	Глицин	30	Инозит	Kolliphor ELP
42	7.5	Глицин	50	Декстроза	Kollidon 12PF
43	7.5	Глицин	10	Сахароза	Kollidon 12PF
44	5	Гистидин	10	Мальтоза	Kolliphor ELP
45	5	Гистидин	10	Сорбит	Kolliphor ELP
46	5	Гистидин	20	Декстроза	Kollidon 12PF
47	5.2	Гистидин	50	Инозит	Kolliphor ELP
48	5.2	Гистидин	50	Мальтоза	Kolliphor ELP
49	5.2	Гистидин	10	Мальтоза	Kollidon 12PF
50	5.5	Гистидин	50	Мальтоза	Tween 40
51	5.5	Гистидин	20	Хлорид натрия	Tween 40
52	5.8	Гистидин	10	Инозит	Kollidon 12PF
53	5.8	Гистидин	10	Инозит	Tween 80
54	5.8	Гистидин	50	Лизин	Kolliphor ELP
55	6	Гистидин	50	Хлорид натрия	Tween 80
56	6	Гистидин	10	Сахароза	Kolliphor ELP
57	6	Гистидин	10	Сорбит	Tween 40
58	6	Гистидин	30	Хлорид натрия	Kollidon 12PF
59	6.5	Гистидин	40	Сорбит	Kollidon 12PF
60	6.5	Гистидин	40	Мальтоза	Tween 80
61	6.5	Гистидин	50	Сахароза	Kollidon 12PF
62	6.5	Гистидин	50	Декстроза	Tween 40
63	6.6	Гистидин	30	Лизин	Tween 80
64	5	Сукцинат	50	Инозит	Kollidon 12PF
65	5	Сукцинат	10	Мальтоза	Kollidon 12PF
66	5	Сукцинат	50	Хлорид натрия	Tween 80
67	5.2	Сукцинат	30	Хлорид натрия	Tween 40
68	5.2	Сукцинат	50	Лизин	Kolliphor ELP
69	5.2	Сукцинат	50	Декстроза	Kollidon 12PF
70	5.4	Сукцинат	10	Мальтоза	Tween 80
71	5.4	Сукцинат	30	Инозит	Tween 40
72	5.4	Сукцинат	10	Декстроза	Tween 40
73	5.5	Сукцинат	30	Хлорид натрия	Kollidon 12PF
74	5.5	Сукцинат	30	Сахароза	Kollidon 12PF
75	5.5	Сукцинат	40	Декстроза	Tween 80
76	5.8	Сукцинат	10	Лизин	Tween 40
77	5.8	Сукцинат	20	Инозит	Kolliphor ELP
78	5.8	Сукцинат	50	Сахароза	Kolliphor ELP
79	6	Сукцинат	30	Сорбит	Tween 80
80	6	Сукцинат	50	Хлорид натрия	Tween 40

В табл. 4 перечислены проведенные аналитические тесты (кратковременная стабильность, механическая нагрузка, воздействие света, F/T) в рамках этого DoE скрининга и представленные и в настоящем изобретении.

Таблица 4

Панель анализов, проведенных на скрининговых составах DoE

Анализ	Начало отсчета	Изучение стабильности (4 недели при 40±2°C 75%RH)	Воздействие светом	Механическая нагрузка	Испытание на замораживание и оттаивание
Содержание белка по ОП	X	-	-	-	-
Агрегация по оптической плотности	X	X	X	X	X
Визуальный осмотр	X	X	X	X	X
Фрагменты LMW посредством Bioanalyzer ¹ (NR)	X	X	-	X	-
LMW и HMW посредством CE-SDS (NR)	X	-	X	-	-
HMW посредством SE-HPLC	X	X	X	X	X
Изоформы посредством cIEF	X	-	X	-	-

¹ Bioanalyzer 2100 (Agilent).

2.1. Способы, используемые для определения стабильности.

Термическая стабильность.

Термическую стабильность составов исследовали после четырех недель хранения при 40±2°C (75% о.в.) для следующего:

индекс агрегации: рассчитывается по оптической плотности для отслеживания агрегации и образования HMW примесей;

визуальный осмотр на наличие видимых частиц;

содержание HMW по SE-HPLC (для отслеживания агрегации);

содержание LMW с помощью биоанализатора (для отслеживания фрагментации).

Воздействие светом.

Составы подвергали воздействию света в течение 7 ч с интенсивностью 765 Вт/м², что удовлетворяет требованиям директивы ICHQ1B. Составы были проанализированы с помощью следующих методов:

индекс агрегации: рассчитывают по ОП, измеряет степень образования агрегатов, возникающую в результате воздействия светом;

визуальный осмотр: на наличие видимых частиц в результате агрегации;

CE-SDS: для производства примесей LMW, также указывающих на HMW примеси;

SE-HPLC: количественное определение HMW примесей, образующихся в результате агрегации;

cIEF: дает представление об относительном количестве вариантов заряда, может контролировать окисление (по продукту от светового воздействия).

Механическая нагрузка.

Механическая (встряхивающая) нагрузка часто связана с образованием агрегатов из-за самоассоциации белка и взаимодействия между гидрофобными участками белка в растворе. Составы DoE в этом исследовании были проверены на устойчивость к вибрации после 24 ч перемешивания при 200 об/мин при комнатной температуре. Составы с встряхивающей нагрузкой анализировали следующим образом:

индекс агрегации: рассчитывают по оптической плотности для отслеживания агрегации и образования HMW примесей;

визуальный осмотр на наличие видимых частиц;

содержание HMW с помощью SE-HPLC (для отслеживания образования HMW примесей и, следовательно, для мониторинга агрегации);

содержание LMW с помощью биоанализаторов (для отслеживания фрагментации).

Испытание на замораживание и оттаивание.

По мере того, как белковый состав замерзает, поверхность раздела образуется, когда в растворе начинают затвердевать микрообласти. В этих микросредах происходит изменение полярности, поскольку разные компоненты буфера для состава исключаются или включаются из жидкой матрицы, которая затвердевает. В результате происходит осаждение белка вследствие воздействия гидрофильных/гидрофобных взаимодействий на молекулы в этих изменяющихся микросредах. Чтобы установить эффективность различных стабилизаторов и поверхностно-активных веществ в DoE, образцы подвергали трем циклам замораживания-оттаивания. Затем образцы были исследованы с помощью следующих анализов для определения их устойчивости к осаждению/агрегации/деградации при замораживании-оттаивании:

индекс агрегации: рассчитывают по оптической плотности для отслеживания агрегации и образования HMW примесей;

визуальный осмотр на наличие видимых частиц;

содержание HMW с помощью SE-HPLC (для отслеживания образования HMW примесей и, следовательно, для мониторинга агрегации).

2.2. Изготовление.

Материал лекарственного вещества композиции: 20,6 мг/мл авелумаб, 51 мг/мл D-маннита, 0,6 мг/мл ледяной уксусной кислоты, pH 5.2 (без поверхностно-активного вещества уравнивали фильтрацией в тангенциальном потоке (с использованием Pellicon XL Cassette Biomaх с отсечкой 10 кДа в PES) в трех буферах:

10 мМ цитрат-фосфат pH 5.2, 10 мМ глицин pH 5.2, 10 мМ гистидин pH 5.2, 10 мМ сукцинат pH 5.2.

Замену буфера осуществляли с 5-кратным разведением вышеуказанного DS в одном из четырех соответствующих буферов и уравниванием/концентрированием до получения начального объема. Операция была повторена три раза. Четыре уравниваемых материала лекарственного вещества были испытаны на содержание белка по ОП перед изготовлением составов.

Составы 1-21 (в цитрат-фосфатном буфере).

Обменный материал DS (26,4 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (30,30 г). При необходимости силу буфера корректировали (начальная молярность обменного DS: 10 мМ; диапазон молярности в формулах DoE: 10-50 мМ) путем добавления дигидрата гидрофосфата динатрия и моногидрата лимонной кислоты. Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли стабилизатор: сорбит (2,04 г) или декстрозу (2,02 г) или инозит (2,02 г) или моногидрат мальтозы (4,04 г) или моногидрохлорид лизина (2,02 г) или хлорид натрия (0,327 г) или сахарозу (3,83 г). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,4 мл 50 мг/мл раствора Tween 40 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 80 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Kolliphor ELP или 20 мг Kollidon 12PF (маточный раствор не требуется). Раствор перемешивали до полного растворения. pH измеряли и доводили до целевого значения разбавленной о-фосфорной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (40 г) с помощью соответствующего буфера.

Составы 22-31 (в глициновом буфере).

Обменный материал DS (24,5 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (32,65 г). При необходимости силу буфера корректировали (начальная молярность обменного DS: 10 мМ; диапазон молярности в формулах DoE: 10-50 мМ) путем добавления глицина. Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли стабилизатор: сорбит (2,04 г) или декстрозу (2,02 г) или инозит (2,02 г) или моногидрат мальтозы (4,04 г) или моногидрохлорид лизина (2,02 г) или хлорид натрия (0,327 г) или сахарозу (3,83 г). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 40 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 80 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Kolliphor ELP или 20 мг Kollidon 12PF (маточный раствор не требуется). Раствор перемешивали до полного растворения. pH измеряли и доводили до целевого значения разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (40 г) с помощью соответствующего буфера.

Составы 32-43 (в глициновом буфере).

Обменный материал DS (23,2 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (34,48 г). При необходимости силу буфера корректировали (начальная молярность обменного DS: 10 мМ; диапазон молярности в формулах DoE: 10-50 мМ) путем добавления глицина. Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли стабилизатор: сорбит (2,04 г) или декстрозу (2,02 г) или инозит (2,02 г) или моногидрат мальтозы (4,04 г) или моногидрохлорид лизина (2,02 г) или хлорид натрия (0,327 г) или сахарозу (3,83 г). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 40 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 80 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Kolliphor ELP или 20 мг Kollidon 12PF (маточный раствор не требуется). Раствор перемешивали до полного растворения. pH измеряли и доводили до целевого значения разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (40 г) с помощью соответствующего буфера.

Составы 64-80 (в янтарном буфере).

Обменный материал DS (22,5 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (35,55 г). При необходимости силу буфера корректировали (начальная молярность обменного DS: 10 мМ; диапазон молярности в формулах DoE: 10-50 мМ) путем добавления янтарной кислоты. Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли стабилизатор: сорбит (2,04 г) или декстрозу (2,02 г) или инозит (2,02 г) или моногидрат мальтозы (4,04 г) или моногидрохлорид лизина (2,02 г) или хлорид натрия (0,327 г) или сахарозу (3,83 г). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 40 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 80 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Kolliphor ELP или 20 мг Kollidon 12PF (маточный раствор не требуется). Раствор перемешивали до полного растворения. pH измеряли и доводили до целевого значения разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (40 г) с помощью соответствующего буфера.

Составы 44-63 (в гистидиновом буфере).

Обменный материал DS (24,4 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (32,80 г). При необходимости силу буфера корректировали (начальная молярность обменного DS: 10 мМ; диапазон молярности в формулах DoE: 10-50 мМ) путем добавления гистидина. Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли стабилизатор: сорбит (2,04 г) или декстрозу (2,02 г) или инозит (2,02 г) или моногидрат мальтозы (4,04 г) или моногидрохлорид лизина (2,02 г) или хлорид натрия (0,327 г) или сахарозу (3,83 г).

Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 40 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Tween 80 или 0,4 мл раствора 50 мг/мл Koliphor ELP или 20 мг Kollidon 12PF (маточный раствор не требуется). Раствор перемешивали до полного растворения. pH измеряли и доводили до целевого значения разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (40 г) с помощью соответствующего буфера.

Фильтрация и наполнение.

Каждый состав фильтровали через фильтр 0,22 мкм, собранный на шприце объемом 50 мл (использовали мембрану Millex GP 0,22 мкм Express PES или мембрану Millex GV 0.22 мкм Durapore PVDF). Затем отфильтрованный раствор заполняли в соответствующий контейнер (2 мл/контейнер).

2.3. Результаты.

Проверка содержания белка по ОП при изготовлении.

Содержание белка определяли по ОП в момент времени 0 (при изготовлении). Были обнаружены значения в соответствии с ожидаемой целью (20 мг/мл).

2.3.1. Термическая нагрузка.

Индекс агрегации по ОП.

Дополнительная информация об индексе агрегации как инструменте обнаружения невидимых невооруженным глазом частиц/более крупных агрегатов, не обнаруживаемых посредством SE-HPLC, представлена в разделе "Приложения".

Было обнаружено, что гистидиновый буфер обычно ассоциируется с более высоким увеличением индекса агрегации при нагрузке (т.е. с большим увеличением частиц), наиболее значительно при повышении pH с 5,0 до 6,6 (pH-зависимый эффект).

В других буферах изменения в индексе агрегации, как правило, ниже, что указывает на меньшее увеличение невидимых невооруженным глазом частиц.

Увеличение индекса агрегации, наблюдаемое в некоторых (нескольких) образцах, составленных в цитрат-фосфатном и глициновом буфере, напрямую не связано с конкретным фактором (например, типом стабилизатора или поверхностно-активного вещества).

Данные были статистически оценены посредством ANOVA для линейной модели поверхности отклика, которая дала следующий результат:

Статистически значимое влияние типа буфера, силы и pH (все имеют значение $p < 0,001$): для минимизации индекса агрегации должны быть направлены низкие концентрации буфера (10 мМ), в связи с низкими диапазонами pH в цитрат-фосфате (4,0-5,0) и глицине (4,0-5,8) и сукцинате (5,0-5,5), в то время как гистидин, как правило, определяет отрицательное влияние на образование невидимых невооруженным глазом частиц/более крупных агрегатов.

Суммарные агрегаты с помощью SE-HPLC.

Количество агрегатов (HMW) определяли с помощью SE-HPLC в момент времени 0 и под термической нагрузкой. Цитрат-фосфат, как правило, приводит к более высокой агрегации, чем эталонная формула (эталонный порог выделен красной горизонтальной полосой на диаграмме), особенно при повышении pH. В глициновом буфере предпочтительны низкие диапазоны pH (ниже 5,0), так как более высокие значения pH связаны с более высокой агрегацией (аналогично использованию цитратного буфера). Сукцинат обычно приводит к более высоким значениям агрегации, чем эталонный, при всех условиях, в то время как гистидиновый буфер при низком pH (5,0-5,5), по-видимому, обеспечивает значения агрегации, сопоставимые с эталонными.

Данные также были статистически оценены с помощью ANOVA для линейной модели поверхности отклика, и было подтверждено, что тип буфера является значимым фактором (p-значение = 0,02).

В целом, чтобы уменьшить агрегаты при термической нагрузке, цитрат-фосфат (диапазон pH 4,0-5,0), глицин (диапазон pH 4,0-6,8) и гистидин (диапазон pH 5,0-5,8) должны быть предпочтительнее сукцинатного буфера.

Комбинации, подобные тем, которые присутствуют в составах № 2 (Tween 40+декстроза в цитрат-фосфатном буфере pH 4,0), состав № 22 (Kollidon 12PF+хлорид натрия в глициновом буфере pH 4,0) и состав № 28 (Tween 40+хлорид натрия в глициновом буфере pH 4,5) по-видимому, неблагоприятны для стабилизации белка (значительное увеличение агрегации, несмотря на применяемые оптимальные условия pH/буфер) возможно, из-за несовместимости Kollidon 12PF и Tween 40 с низким pH (приблизительно 4,0-4,5)/взаимодействия со специфическими стабилизаторами, такими как хлорид натрия.

Фрагменты посредством Bioanalyzer.

Уровни фрагментации оценивали с помощью Bioanalyzer. Хотя никакие статистически значимые результаты не могли быть выделены путем оценки ANOVA, можно выделить условия, которые наиболее эффективны для минимизации фрагментации, обеспечивающие процентное соотношение LMW в соответствии с эталонной композицией: цитрат-фосфатный буфер в диапазоне pH 4,5-7,0, глициновый буфер в диапазоне pH 4,0-5,8.

Учитывая изменчивость метода (до $\pm 2-3\%$ в LMW является обычным явлением при применении Bioanalyzer), другие условия (такие как оставшиеся композиции в гистидиновых и сукцинатных буферах) наблюдали для поддержания % LMW относительно низкими и поэтому их стоит исследовать дальше.

Видимые частицы при визуальном осмотре.

Наличие видимых частиц оценивали визуальным осмотром до и после термической нагрузки. Изменяющиеся условия в цитрат - фосфатном буфере могут генерировать наличие видимых частиц (чаще всего твердые частицы -такие как в суспензии) после термической нагрузки.

В глициновом буфере образование частиц чаще всего связано с присутствием видов Tween species (образец ID № 23, 24, 26, 28, содержащий Tween 40) и состав № 30, содержащий Tween 80. Другие составы в глициновом буфере (образец ID от № 32 до 39), показали наличие частиц в момент времени 0, которые имели тенденцию к уменьшению при нагрузке (возможные обратимые кластеры).

В гистидине виды Tween обычно связаны с образованием видимых частиц при нагрузке (все составы, показывающие видимые частицы после нагрузки содержат одну из двух альтернатив Tween).

Было обнаружено, что в сукцинатном буфере частицы, наблюдаемые в момент времени 0 в большинстве составов, уменьшаются при термической нагрузке (возможное нарушение обратимых ассоциаций с течением времени).

Выводы: термическая нагрузка.

В соответствии с SE-HPLC, ОП и Bionalyzer при термической нагрузке, условия, которые могут обеспечить благоприятные характеристики, включают:

буферы: цитрат-фосфат или глицин (преимущественно при более кислом pH и наиболее актуально в диапазоне 4,0-5,0 для цитрат фосфата и 4,0-5,8 для глицина),

концентрация буфера: преимущественно низкая (согласно результату индекса агрегации),

стабилизатор: конкретные показания не получены, Поверхностно-активное вещество: Kolliphor ELP, как было обнаружено, эффективен в уменьшении невидимых невооруженным глазом частиц.

2.3.2. Воздействие светом.

Индекс агрегации по ОП.

Было обнаружено, что индекс агрегации в большинстве композиций DoE в цитрат-фосфатном буфере выше, чем в контрольной формуле (наиболее значительно в более высоком диапазоне pH). Эффект pH был также подтвержден в глициновом буфере, который, как было установлено, значительно снижал индекс агрегации по отношению к цитрат-фосфатному буферу (в диапазоне pH 4,0-4,5 были выделены значения, сопоставимые с эталонными композициями или ниже). Гистидин обычно может вызывать значительное увеличение индекса агрегации, также как и сукцинатный буфер (гистидин заметно хуже, чем сукцинат).

Статистический анализ, проведенный ANOVA, подтвердил значительное влияние типа буфера, pH и концентрации (p - значение $<0,0001$), что свидетельствует о том, что наилучшие условия для минимизации образования частиц включают использование цитрат-фосфатного буфера (в диапазоне 4,0-5,0 и при низкой концентрации буфера), глицин (в диапазоне 4,0-5,8).

Было также обнаружено, что поверхностно-активное вещество оказывает некоторое влияние на стабильность, поскольку Kolliphor ELP является наилучшим вариантом, который следует принимать во внимание при стремлении к уменьшению количества частиц.

Суммарные агрегаты с помощью SE-HPLC.

Количество агрегатов (HMW) определяли с помощью SE-HPLC в момент времени 0 и под воздействием стресса от светового излучения. Цитрат-фосфат, как правило, приводит к более высокой агрегации, чем эталонная формула, особенно при повышении pH. В глициновом буфере предпочтительны низкие диапазоны (ниже 4,8), так как более высокие значения pH связаны с более высокой агрегацией (аналогично использованию цитратного буфера). Сукцинат обычно приводит к более высоким значениям агрегации, чем эталонный, при всех условиях, в то время как гистидиновый буфер (весь диапазон, за исключением нескольких исключений) по-видимому, обеспечивает значения агрегации, сопоставимые с эталонными.

Данные также были статистически оценены с помощью ANOVA для линейной модели поверхности отклика, и было подтверждено, что тип буфера является значимым фактором (p -значение $<0,0001$).

В целом, для того, чтобы уменьшить агрегаты при термической нагрузке, глицин (диапазон pH 4,0-5,0) и гистидин (диапазон pH 5,0-6,0) должен быть предпочтительнее, чем сукцинатный и цитрат-фосфатный буферы.

Важно, что стабилизаторы, такие как лизин, декстроза, сорбит и сахароза обеспечивают лучшую стабилизацию от воздействия светом, чем хлорид натрия, мальтоза и инозит (p - значение $<0,01$).

Чистота посредством CE-SDS.

Чистота, определенная с помощью CE-SDS, несет информацию как о HMW, так и о LMW видах, поскольку она является результатом расчета: $100 - \% \text{ HMW с помощью CE-SDS} - \% \text{ LMW с помощью CE-SDS}$.

Значения чистоты были определены до и после воздействия светом.

Большинство составов демонстрируют более высокую чистоту, чем эталонные составы под воздействием стресса от светового излучения. Условиями, которые могут отрицательно влиять на стабильность, обычно являются: цитрат фосфат при высоком pH ($>7,0$) и глициновый буфер при низком pH (4,0); последнее, скорее всего, объясняется отрицательным влиянием от Tween 40/Kollidon 12PF при низком pH.

Было обнаружено, что гистидин положительно влияет на чистоту, максимизируя эффективность состава против воздействия света.

Статистический анализ посредством ANOVA подтвердил превосходное свойство, связанное с использованием гистидина в качестве буфера, с сопоставимыми характеристиками, полученными при использовании цитрат-фосфатного, глицинового или сукцинатного буферов.

Профиль изоформ по cIEF.

Профили изоформ определяли в момент времени 0 и после воздействия света. Воздействие света обычно определяет увеличение кислотных изоформ из-за явлений фотоокисления. Такое увеличение было рассчитано для всех составов DoE.

Несколько условий являются благоприятными для стабилизации белка (т.е. более низкие изменения в профиле изоформ), такие как цитрат-фосфатный и глициновый буфер (наиболее типично в более низком диапазоне pH). Более низкие показатели наблюдаются, когда гистидин используют в качестве буфера состава.

Данные, оцененные посредством ANOVA для линейной модели поверхности отклика, подтвердили указанное выше (статистически значимый фактор типа буфера с р-значением <0,0001).

Статистический анализ также подтвердил положительное влияние (уменьшение изменения кислотных изоформ), когда L-лизин используют в качестве стабилизатора. Эффект достаточно очевиден при наблюдении изменений, обнаруженных в составах № 11, 29, 31, 38, значительно меньших, чем изменения в окружающем пространстве состава с альтернативными стабилизаторами.

Видимые частицы при визуальном осмотре.

Наличие видимых частиц оценивали визуальным осмотром до и после стресса от воздействия светового излучения. Большинство составов не подвержены воздействию светового стресса по причине видимых частиц. Нет особых условий, связанных с образованием частиц под воздействием стресса от светового излучения.

Вывод: стресс от воздействия светового излучения.

В соответствии с SE-HPLC, ОП, CE-SDS, cIEF и визуальный осмотр под воздействием стресса от светового излучения, условия, которые могут обеспечить благоприятные характеристики, включают:

буферы: глициновый буфер (преимущественно при более кислом pH и наиболее актуально в диапазоне 4,0-4,5),

концентрация буфера: преимущественно низкая (согласно результату индекса агрегации),

стабилизатор: лизин (моногидрохлорид), декстроза и сорбит показал положительное влияние на стабильность белка,

поверхностно-активное вещество: Kolliphor ELP как было обнаружено, эффективен в уменьшении невидимых невооруженным глазом частиц.

2.3.3. Замораживание-оттаивание.

Индекс агрегации по оптической плотности.

После 3X циклов замораживания-оттаивания (-80°C → комнатная температура), еще раз подтверждается, что глициновый буфер (низкий pH) обеспечивает самые низкие значения, указывающие на более низкое образование частиц. Увеличение индекса агрегации наблюдают как в цитрат-фосфатном буфере, так и в глициновом буфере при увеличении pH (эффект pH более критичен в цитрат-фосфатном буфере). Обычно более высокие значения индекса агрегации, чем у контрольной композиции, наблюдают в гистидиновом и сукцинатном буферах.

Статистический анализ посредством ANOVA выявил умеренно значимое влияние типа буфера, pH и типа поверхностно-активного вещества (0,01 < р-значение < 0,05), указывая на то, что цитрат-фосфатный и глициновый буферы при pH ниже 6,0 являются лучшим вариантом для стабилизации белка против образования частиц, вызванного замораживанием-оттаиванием, так как сукцинат и гистидиновый буфер слегка неблагоприятны по отношению к контрольной композиции.

Сравнение воздействия различных поверхностно-активных веществ показывает сравнимые характеристики от Tween 80, Kollidon 12PF и Kolliphor ELP (слегка предпочтительнее), в то время как Tween 40, как ожидается, увеличит индекс агрегации.

Суммарные агрегаты с помощью SE-HPLC.

Все составы показывают более низкие суммарные агрегаты, чем контрольная композиция при стрессе замораживания и оттаивания (значения, сопоставимые со временем 0).

В цитрат-фосфатном буфере агрегаты имеют тенденцию увеличиваться до уровня эталонной композиции, поскольку первичный эффект pH (2,0-2,5% HMW) увеличивается до диапазона 7,0-7,5 с меньшими/незначительными изменениями при замораживании-оттаивании, в то время как при pH < 7,0 суммарные агрегаты обычно составляют менее 1,5% (до и после нагрузки).

В глициновом и гистидиновом буфере все значения суммарных агрегатов после нагрузки составляют менее 1% (сопоставимо со значениями времени 0). В сукцинате не было обнаружено, что замораживание-оттаивание определяет критические изменения в отношении времени 0, однако суммарные агрегаты, как правило, немного выше, чем в глицине и гистидине (все еще равны или ниже 1,5%, то есть значительно ниже, чем эталонные после нагрузки).

Статистический анализ подтвердил значительное влияние типа буфера и pH (значение $p < 0.0001$), поскольку цитрат-фосфатный буфер (pH 4,0-6,0), глициновый буфер (pH 4,0-7,0) и гистидин (5,0-6,6) являются наилучшими вариантами для стабилизации белка от замораживания - оттаивания.

Значительное влияние (значение $p < 0,01$) также было выделено для фактора типа стабилизатора: гидрохлорид лизина сводит к минимуму агрегацию времени 0 и эффекты, связанные с нагрузкой замораживание-оттаивание (см. ИД образца № 6-9-11-17 в цитратном буфере); сахароза и декстроза аналогично проявляют стабилизирующие свойства.

Видимые частицы при визуальном осмотре.

По результатам визуального осмотра при замерзании-оттаивании можно выделить общие тенденции:

- в цитрат-фосфатном, образование частиц более вероятно при более высоком pH,
- в глициновом буфере при низком pH (< 5) образование частиц связано главным образом с присутствием Tween 40 (дестабилизирующего поверхностно-активного вещества),
- в гистидиновом буфере виды Tween обычно связаны с образованием частиц,
- в сукцинате, кажется, нет специфических факторов, связанных с образованием частиц, что, тем не менее, довольно часто встречается при использовании этого буфера.

Вывод: нагрузка замораживание-оттаивание.

В соответствии с SE-HPLC, ОП и визуальным осмотром при 3X циклах замораживания - оттаивания ($-80^{\circ}\text{C} \rightarrow$ комнатная температура), условия, которые могут обеспечить благоприятные улучшенные характеристики, включают:

буферы: глицин или цитрат-фосфатные буферы (преимущественно при более кислых значениях pH и наиболее предпочтительно в диапазоне 4,0-6,0),

стабилизатор: лизин (моногоидрохлорид), декстроза и сахароза показали положительное влияние на стабильность белка (уменьшение общего количества агрегатов с помощью SE-HPLC),

поверхностно-активное вещество: следует принимать во внимание несовместимость видов Tween с забуференными глицином и гистидином составами и избегать их, чтобы минимизировать образование видимых частиц.

2.3.4. Механическая нагрузка.

Индекс агрегации по оптической плотности.

Как было показано ранее, факторы, которые допускают значения индекса агрегации, наиболее похожие на эталонные (то есть минимальные или не увеличивающиеся по времени 0) представляют собой:

Цитрат-фосфат, как правило, приводит к более высоким значениям индекса агрегации, чем эталонный, особенно при повышении pH и в присутствии видов Tween: ИД образца № 2 (Tween 40), № 8 (Tween 80), № 11 (Tween 40), № 19 (Tween 40), № 21 (Tween 40).

Глицин обеспечивает явный стабилизирующий эффект в диапазоне низких значений pH (значения индекса агрегации немного ниже, чем у контрольных).

Гистидиновый буфер предпочтительно следует использовать при значениях pH близких к 5,0 и без Tween 40 и Tween 80, что, по-видимому, связано с самыми высокими значениями индекса агрегации: ИД образца № 50 (Tween 40), № 60 (Tween 80), № 62 (Tween 40).

Сукцинат, как правило, приводит к тому, что значения индекса агрегации немного выше, чем у контрольной композиции, независимо от конкретных вовлеченных факторов.

Вышеуказанные результаты были подтверждены посредством ANOVA, который указал тип буфера и pH в качестве статистически значимых факторов (значение $p < 0.01$) и поверхностно-активное вещество в качестве умеренно значимого фактора ($0.01 < \text{значение } p < 0.05$).

Глициновый буфер при низком pH (4,0-5,5) выделяется в качестве буфера выбора, чтобы минимизировать индекс агрегации. Тенденция к увеличению индекса агрегации, заданного видами Tween (Tween 40 хуже, чем Tween 80), подтверждается моделями поверхностного отклика.

Суммарные агрегаты с помощью SE-HPLC.

Минимальное увеличение относительно времени 0 наблюдали для большинства составов, что указывает на незначительное влияние этого типа нагрузки. Как уже было отмечено, дифференциация по суммарным агрегатам, по-видимому, является первичным эффектом типа буфера и pH.

Тип буфера и pH подтверждены статистически значимыми факторами посредством ANOVA (значение $p < 0,0001$); а также концентрация буфера (значение $p < 0,01$) и тип стабилизатора ($0,01 < \text{значение } p < 0,05$).

Предпочтительные диапазоны и условия для минимизации агрегатов до уровня эталонной композиции ($< 1\%$) включают: цитрат-фосфатный буфер (pH < 5 и низкая ионная сила); глициновый буфер (весь диапазон pH и ионной силы); гистидиновый буфер (весь спектр) и сукцинатный буфер (pH 5,0-5,5 и низкая ионная сила). Предпочтительными стабилизаторами являются моногоидрохлорид L-лизина, мальтоза, сахароза и декстроза.

Фрагменты посредством Bioanalyzer.

За исключением ИД образца № 22-23-24 (в глициновом буфере, pH 4.0, содержащем Tween 40 или Kollidon 12PF), остальные составы показали LMW %, сопоставимые или меньшие, чем у контрольной

композиции при механической нагрузке, также принимая во внимание изменчивость этого метода ($\pm 2-3\%$ в LMW% результатов является характерным). Таким образом, можно сделать вывод, что большинство протестированных условий могут помочь улучшить устойчивость белка к фрагментации при условии, что избегаются такие комбинации, как глициновый буфер (низкий pH) + Tween 40.

Статистическая разработка выдвинула на первый план лучшие характеристики составов в сукцинатном и гистидиновом буферах, которые, однако должны быть тщательно рассмотрены и оценены как существенно сопоставимые с/немного лучше, чем другие формулы в цитрат-фосфатном и глициновом буфере из-за рассмотренной выше изменчивости метода. Видимые частицы при визуальном осмотре

В результатах визуального осмотра при замораживании-оттаивании выделяются общие тенденции:

в цитрат-фосфатном буфере (ИД образца № 1-21), образование частиц происходит практически при любых условиях, независимо от вовлеченных конкретных факторов,

в глициновом буфере образование частиц связано в первую очередь с присутствием Tween 40 (ИД образца № 23, 26, 28 и Kollidon 12PF (составы № 22, 32, 37, 43),

в гистидиновом буфере все формулы, показывающие увеличение видимых частиц при механическом встряхивании, содержат либо Tween 40, либо Tween 80,

в сукцинате, кажется, нет конкретных факторов, связанных с образованием частиц.

Вывод: механическая нагрузка.

В соответствии с SE-HPLC, ОП, Bioanalyzer и визуальным осмотром при механическом встряхивании, которые могут обеспечить благоприятные характеристики в отношении эталонных композиций, включают:

буферы: глицин (преимущественно при более кислом pH и наиболее предпочтительно в диапазоне 4,0-5,5), гистидин и сукцинат при pH приблизительно 5,0.

Стабилизатор: лизин (моногоидрохлорид), сахароза, мальтоза и декстроза показали положительное влияние на стабильность белка (уменьшение общего количества агрегатов с помощью SE-HPLC),

Поверхностно-активное вещество: следует принимать во внимание несовместимость видов Tween с забуференными глицином и гистидином составами и избегать их, чтобы минимизировать образование видимых частиц.

Пример 3. Оптимизация составов.

3.1. Оптимизация состава.

Данные, показанные в примере 2, были объединены, чтобы идентифицировать пространство состава, которое могло бы надлежащим образом стабилизировать авелумаб (оцениваемые факторы: тип буфера, pH и силу, тип стабилизатора и поверхностно-активное вещество) против термической, замораживания - оттаивание, механической и световой нагрузки.

Используя следующие критерии минимизировать HMW (посредством SE-HPLC) после термической нагрузки, механического встряхивания, замораживания-оттаивания и воздействия светом, минимизировать LMW (посредством Bioanalyzer) после термической нагрузки и механического встряхивания, максимизировать чистоту (посредством CE-SDS) после воздействия светом, минимизировать изменение кислых изоформ (посредством cIEF) после воздействия светом, значения индекса целевой агрегации (по ОП) ниже 2 после термической нагрузки, механического встряхивания, замораживания-оттаивания и воздействия светом, для каждого типа буфера 10 наиболее перспективных составов были экстраполированы, как показано в табл. 5.

Таблица 5

Испытываемые составы (экстраполяция DoE)

Номер	pH буфера	Буферная сила (мМ)	ПАВ (0,5 мг/мл)	Стабилизатор (280 мМ)	Тип буфера
1	4,4	10	Kolliphor ELP	Лизин	Глицин
2	4,1	10	Tween 80	Лизин	Глицин
3	4,0	10	Tween 80	Лизин	Глицин
4	4,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Глицин
5	4,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Глицин
6	4,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Глицин
7	4,0	10	Kollidon 12PF	Лизин	Глицин
8	4,0	10	Kolliphor ELP	Сорбит	Глицин
9	4,0	10	Kolliphor ELP	Сахароза	Глицин
10	4,0	10	Kolliphor ELP	Сахароза	Глицин

1	4,0	10	Kollidon 12PF	Сорбит	Цитрат-фосфат
2	4,2	15	Kollidon 12PF	Лизин	Цитрат-фосфат
3	4,3	17	Kollidon 12PF	Сахароза	Цитрат-фосфат
4	4,1	20	Kollidon 12PF	Лизин	Цитрат-фосфат
5	4,1	15	Tween 80	Лизин	Цитрат-фосфат
6	4,0	27	Kollidon 12PF	Сахароза	Цитрат-фосфат
7	4,1	19	Kolliphor ELP	Сахароза	Цитрат-фосфат
8	4,1	22	Kolliphor ELP	Декстроза	Цитрат-фосфат
9	4,2	13	Tween 80	Сорбит	Цитрат-фосфат
10	4,2	17	Kolliphor ELP	Декстроза	Цитрат-фосфат
1	5,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гистидин
2	5,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гистидин
3	5,0	10	Kolliphor ELP	Сорбит	Гистидин
4	5,0	10	Kolliphor ELP	Сахароза	Гистидин
5	5,0	11	Kolliphor ELP	Сахароза	Гистидин
6	5,1	10	Kolliphor ELP	Сорбит	Гистидин
7	5,1	10	Kolliphor ELP	Сахароза	Гистидин
8	5,0	10	Kolliphor ELP	Инозит	Гистидин
9	5,0	15	Kolliphor ELP	Сорбит	Гистидин
10	5,0	10	Kolliphor ELP	Лизин	Гистидин
1	5,0	10	Kollidon 12PF	Сахароза	Сукцинат
2	5,0	10	Kolliphor ELP	Лизин	Сукцинат
3	5,0	10	Kolliphor ELP	Лизин	Сукцинат
4	5,0	12	Kolliphor ELP	Лизин	Сукцинат
5	5,1	10	Kolliphor ELP	Лизин	Сукцинат
6	5,1	10	Kollidon 12PF	Сахароза	Сукцинат
7	5,0	10	Kollidon 12PF	Сорбит	Сукцинат
8	5,0	10	Kollidon 12PF	Лизин	Сукцинат
9	5,0	10	Kollidon 12PF	Декстроза	Сукцинат
10	5,0	14	Kollidon 12PF	Сахароза	Сукцинат

3.2. Ведущие составы для дальнейшей оценки.

Из составов табл. 5 одиннадцать составов, перечисленных в табл. 6, оказались наиболее перспективными. Следовательно, они были изготовлены и оценены под термической нагрузкой и повторных циклов замораживания-оттаивания согласно аналитической панели, показанной в табл. 7.

Термическая нагрузка была выбрана в качестве наиболее релевантных стрессовых условий для оценки характеристик состава и, возможно, для прогнозирования стабильности в условиях охлаждения. Замораживание-оттаивание также рассматривалось для того, чтобы предвидеть любые проблемы, связанные с температурными колебаниями/хранением предварительно составленных материалов DS.

Результаты экспериментов, проведенных на этих составах, описаны в следующих абзацах.

Таблица 6

Ведущие составы, полученные из DoE

DP	pH (± 0,1)	Буфер	Буферная сила (мМ)	Стабилизатор	ПАВ (0,5 мг/мл)
1	4.4	Глицин	10	Лизин (моногидрохлорид) 280 мМ	Kolliphor ELP
2	4.4	Глицин	10	Лизин (моногидрохлорид) 140 мМ	Kolliphor ELP
3	4.4	Глицин	10	Лизин (моногидрат) 280 мМ	Kolliphor ELP
4	4.4	Глицин	10	Ацетат лизина 140 мМ	Kolliphor ELP
5	4.1	Глицин	10	Лизин (моногидрат) 280 мМ	Tween 80
6	5.0	Гистидин	10	Декстроза 280 мМ	Kolliphor ELP
7	5.0	Гистидин	10	Сахароза 280 мМ	Kolliphor ELP
8	4.2	Цитрат- фосфат	15	Лизин (моногидрохлорид) 140 мМ	Kollidon 17PF
9	4.3	Цитрат- фосфат	17	Сахароза 280 мМ	Kollidon 17PF
10	5.0	Сукцинат	10	Лизин (моногидрохлорид) 140 мМ	Kolliphor ELP
11	5.0	Сукцинат	10	Сахароза 280 мМ	Kollidon 17PF

Таблица 7

Панель анализов, проведенных на ведущих составах

Тест	Время 0	Термическая нагрузка (4 недели при 40±2°C 75% ОВ)	Заморажи- вание- оттаивание 3X
Видимые частицы (визуально)	x	X	x
pH	x	X	-
Мутность (ОП)	x	X	x
Невидимые частицы (PAMAS)	x	X	x
Содержание белка (ОП)	x	X	-
HMW посредством SE - HPLC	x	X	x
LMW посредством Bioanalyzer	x	X	-
Профиль изоформ посредством iCE	x	X	-
Третичная структура посредством CD	x	X	-

3.3. Изготовление ведущих составов, полученных из стадии DoE.

Материал лекарственного вещества состава: 18,6 мг/мл авелумаба, 51 мг/мл D-маннита, 0,6 мг/мл ледяной уксусной кислоты, pH 5,2 (без поверхностно-активного вещества) уравнивали фильтрацией в тангенциальном потоке (с использованием кассеты Pellicon XL Biotech с отсечкой 50 КДа в PES) в трех буферах:

- 10 mM глицин pH 4,4,
- 10 mM гистидин pH 5,0,
- 15 mM цитрат-фосфат pH 4,2,
- 10 mM сукцинат pH 5,0.

Замену буфера осуществляли с 5-кратным разведением вышеуказанного DS в одном из четырех соответствующих буферов и уравниванием/ концентрированием до получения начального объема. Операция была повторена три раза. Четыре уравниваемых материала лекарственного вещества были испытаны на содержание белка по OD перед изготовлением составов.

Составы 1-5 (в глициновом буфере).

Обменный материал DS (21,8 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (64,2 г). Затем добавляли стабилизатор: моногидрохлорид лизина (3,58 г для DP1 или 1,79 г для DP2) или моногидрат лизина (3,22 г для DP3 и DP5) или ацетат лизина (2,02 г для DP4). Раствор перемешивали до полного растворения.

Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,7 мл 50 мг/мл раствора Kolliphor ELP (в 10 mM глицин pH 4,4 для DP 1-2-3-4) или 0,7 мл 50 мг/мл Tween 80 (в 10 mM глицин pH 4,1 для DP5). Раствор перемешивали до полного растворения. pH измеряли и доводили до целевого значения разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (70 г) с помощью соответствующего буфера.

Составы 6-7 (в гистидиновом буфере).

Обменный материал DS (23,2 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (60,3 г). Затем добавляли стабилизатор: декстрозу (3,53 г для DP6) или сахарозу (6,71 г для DP7). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,7 мл раствора 50 мг/мл Kolliphor ELP (в 10 mM гистидинового буфера pH 5,0 для DP6 и 7). Раствор перемешивали до полного растворения. Значение pH измеряли и устанавливали до целевого (pH 5,0) с разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (70 г) с помощью соответствующего буфера (10 mM гистидиновый буфер pH 5,0).

Составы 8-9 (в цитратно-фосфатном буфере).

Обменный материал DS (23,4 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (59,8 г). При необходимости (DP9), концентрация буфера была отрегулирована путем добавления лимонной кислоты (моногидрат) и гидрофосфат динатрия (дигидрат). Затем добавляли стабилизатор: моногидрохлорид лизина (1,79 г для DP8) или сахарозу (6,71 г для DP9). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 35 мг Kollidon 17PF (для обоих DP8 и 9). Раствор перемешивали до полного растворения. Значение pH измеряли и устанавливали до целевого (pH 4,2 для DP8 и 4,3 для DP9) с разбавленной о-фосфорной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор доводили до конечной массы (70 г) с помощью соответствующего буфера.

Составы 10-11 (в сукцинатном буфере).

Обменный материал DS (24,5 мг/мл) взвешивали в стеклянном стакане (57,1 г). Затем добавляли стабилизатор: моногидрохлорид лизина (1,79 г для DP10) или сахарозу (6,71 г для DP11). Раствор перемешивали до полного растворения. Затем добавляли поверхностно-активное вещество: 0,7 мл маточного раствора 50 мг/мл Kolliphor ELP в 10 mM сукцинатного буфера pH 5,0 (DP10) или 35 мг Kollidon 17PF (DP11). Раствор перемешивали до полного растворения. Значение pH измеряли и устанавливали до целе-

вого (рН 5,0 для DP10 и 11) с разбавленной соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор довели до конечной массы (70 г) с 10 мМ сукцинатного буфера рН 5,0.

3.4. Результаты.

3.4.1. Термическая нагрузка.

Содержание белка по ОП: никаких значительных изменений в отношении времени 0 после 4 недель при 40°C не наблюдали.

рН: значения рН в момент времени 0 соответствовали цели. Никаких серьезных изменений не наблюдали в отношении времени 0 после 4 недель при 40°C.

Видимые частицы при визуальном осмотре.

Было обнаружено, что все составы не содержат видимых частиц в период времени 0. В стрессовых условиях один состав (DP6) показал наличие частиц (возможно, связанный с составом).

Мутность путем нефелометрии.

Большинство составов имеют значения мутности в прозрачном или слегка опалесцирующем диапазоне с минимальными изменениями после нагрузки (DP 2-4-6-7-9-10-11). Другие составы показывают либо более высокие изменения мутности от слегка опалесцирующего до опалесцирующего диапазона (DP1), либо значения в опалесцирующем диапазоне уже в момент времени 0 с меньшими/незначительными изменениями после нагрузки (DP 3-8). Состав DP5 показывает значительное увеличение мутности (>18 NTU) после нагрузки.

Невидимые невооруженным глазом частицы при затемнении светом.

Частицы ≥ 25 микрон были значительно ниже предела фармакопей 600 частиц/контейнер (типично <100 частиц).

Частицы ≥ 1 микрон имели несколько большее количество, но все еще были ниже предела 6000 частиц/контейнер. DP8 и 9, в цитрат-фосфатном буфере показали более высокие показатели, чем другие (все еще ниже вышеуказанного предела) в момент времени 0, со значительным снижением после нагрузки.

Суммарные агрегаты с помощью SE-HPLC,

Что касается суммарных агрегатов с помощью SE - HPLC в момент времени 0 и после термической нагрузки, DP 1-2-3-4 (глициновый буфер) варьировался в зависимости от типа и количества стабилизатора, но имел одинаковую силу буфера, поверхностно-активное вещество и рН): уменьшение моногидрохлорида лизина с 280 мМ (DP1) до 140 мМ (DP2), по-видимому, способствует стабильности белка. Более высокая скорость агрегации была подтверждена при использовании моногидрата лизина при 280 мМ (DP3). Ацетат лизина (140 мМ) давал те же характеристики, что и моногидрохлорид лизина, используемый в той же концентрации (DP2).

DP5 (глициновый буфер) показал значительное увеличение агрегатов (вероятно, из-за неблагоприятной комбинации моногидрата лизина при 280 мМ+Tween 80 вместо Kolliphor ELP).

DP6-7 (гистидиновый буфер) не показал изменений в агрегатах.

DP8-9 (цитрат-фосфатный буфер): сахароза в DP9, по-видимому, является критическим фактором, который может значительно улучшить характеристики состава по сравнению с DP8 (моногидрат лизина), так как другие ингредиенты/параметры очень похожи (тот же тип буфера, то же поверхностно-активное вещество и подобный рН: 4,2 против 4,3).

DP10-11 (сукцинатный буфер): значительных изменений в агрегации не наблюдали (аналогичные характеристики моногидрата лизина и сахарозы в этом буфере).

Низкий молекулярный вес с помощью Bioanalyzer.

Фрагменты с помощью Bioanalyzer в момент времени 0 и после термической нагрузки:

DP 1-2-3-4 (глициновый буфер) варьировался в зависимости от типа и количества стабилизатора, но имел одинаковую силу буфера, поверхностно-активное вещество и рН): подобное увеличение фрагментов (+3-5% после нагрузки);

DP5 (глициновый буфер) показал значительное увеличение у видов с более низким молекулярным весом (вероятно, из-за неблагоприятной комбинации моногидрата лизина при 280 мМ+Tween 80 вместо Kolliphor ELP):+увеличение на 13% после нагрузки;

DP6-7 (гистидиновый буфер) не показал изменений во фрагментах.

DP8-9 (цитрат-фосфатный буфер): сахароза в DP9 (+6% во фрагментах после нагрузки), по-видимому, является критическим фактором, который может значительно улучшить характеристики состава по сравнению с DP8 (моногидрат лизина; +11% во фрагментах), так как другие ингредиенты/параметры очень похожи (тот же тип буфера, то же поверхностно-активное вещество и похожий рН: 4,2 против 4,3);

DP10-11 (сукцинатный буфер): минимальные изменения для обоих (аналогичные характеристики моногидрата лизина и сахарозы в этом буфере): +1-3% у видов с более низким молекулярным весом после нагрузки.

Профиль изоформ с помощью cIEF.

Профиль изоформ в момент времени 0 и после термической нагрузки: при термической нагрузке все образцы обычно имеют тенденцию терять часть основных видов с одновременным увеличением ки-

слотных видов и незначительными изменениями основных изоформ. Более подробно: DP 1-2-3-4-5 (глициновый буфер): аналогичные изменения наблюдали в профиле изоформ. Для пяти образцов основные виды уменьшились приблизительно на 10-12% (увеличение кислотных изоформ на 14-17% и уменьшение основных изоформ на -4/-6%).

DP6-7 (гистидиновый буфер): DP6 показал значительные изменения в профиле изоформ, и полученные профили не могли быть разработаны из-за вероятной нестабильности от выбранных компонентов и или загрязнения образца до анализа. DP7 показал изменения, аналогичные образцам в глициновом буфере.

DP8-9 (цитрат-фосфатный буфер): значительные изменения в обоих составах, более высокие, чем наблюдаемые в других буферах. Было обнаружено, что кислотные виды увеличиваются до 24-29% после нагрузки.

DP10-11 (сукцинатный буфер): DP10 показал минимальные изменения, даже ниже, чем у других образцов в других буферах: основные виды уменьшились приблизительно на 7% (увеличение кислотных изоформ приблизительно на 12% и уменьшение основных изоформ приблизительно на -5%). DP11 показал более высокие изменения (увеличение кислотных изоформ после нагрузки составило +20%).

Третьичная структура по круговому дихроизму.

Круговой дихроизм проводили до и после нагрузки на ведущие составы.

Образцы разбавляли с WFI до 1,5 мг/мл и затем тестировали в кварцевых кюветах с длиной пути 1 см на спектрополяриметре Jasco J-810 в диапазоне 250-320 нм при скорости сканирования 20 нм/мин (чувствительность:

стандартная; полоса пропускания: 1 мм; шаг данных 0,2 нм; D.I.T.: 8 с; 4 повторения) при комнатной температуре.

Конформация белка в большинстве составов может быть эффективно сохранена с небольшими изменениями в области 260-280 нм (сигналы тирозина и фенилаланина). Однако можно наблюдать несколько исключений, которые могут указывать на частичное разрушение/развёртывание и потерю структуры после термической нагрузки: DP5 (возможное влияние присутствующего типа поверхностно-активного вещества), DP8 и 9 (составы в цитрат-фосфатном буфере; возможное влияние типа буфера и комбинации с другими присутствующими ингредиентами).

3.4.2. Замораживание-оттаивание.

Видимые частицы при визуальном осмотре.

Не было обнаружено, что повторные циклы FT вызывают значительное увеличение видимых частиц. При нагрузке некоторые составы представляют собой волокнообразные частицы (не в виде частиц/осадка или других форм, обычно связанных с составом).

Мутность путем нефелометрии.

При замораживании-оттаивании в тестируемых составах не происходит значительных изменений. Большинство составов являются прозрачными или слегка опалесцирующими в момент времени 0 и после нагрузки (исключение: DP3, 5, 8, диапазон опалесцирующего раствора в момент времени 0, с незначительными изменениями после нагрузки).

Невидимые невооруженным глазом частицы при затемнении светом

Частицы ≥ 25 микрон были значительно ниже фармакопейного предела в 600 частиц/контейнер (обычно ≤ 100 частиц).

Частицы ≥ 10 микрон имели большее количество, но все еще ниже предела 6000 частиц/контейнер. DP8 и 9, в цитрат-фосфатном буфере показывают более высокие показатели, чем другие (все еще ниже вышеуказанного предела) в момент времени 0, без дальнейшего увеличения при нагрузке FT).

Суммарные агрегаты с помощью SE-HPLC

В суммарных агрегатах с помощью SE-HPLC до и после нагрузки FT, минимальные изменения наблюдали для всех составов (общее количество агрегатов увеличилось на 0,2-0,5% после 3 циклов FT).

3.5. Заключение.

В глициновом буфере, наиболее пригодные условия для стабилизации антител включают:

низкая ионная концентрация (10 мМ),

низкое pH (4,0-4,4),

лизин (моногидрохлорид), декстроза, сахароза и сорбит в качестве стабилизаторов,

предпочтительные поверхностно-активные вещества: Kolliphor ELP и Kollidon 12PF (Tween 80 возможно, следует избегать из-за проблем с видимыми частицами).

В сукцинатном буфере, наиболее пригодные условия для стабилизации антител включают:

низкая ионная концентрация (10 мМ),

pH 5,0-5,1;

лизин (моногидрохлорид), декстроза, сахароза или сорбит в качестве стабилизаторов,

предпочтительные поверхностно-активные вещества: Kolliphor ELP и Kollidon 12PF (Tween 80 возможно, следует избегать из-за проблем с видимыми частицами).

В цитрат-фосфатном буфере, наиболее пригодные условия для стабилизации антител включают:

низкая ионная концентрация (10-30 мМ),
 низкое рН (4,0-4,5),
 лизин (моногидрохлорид), декстроза, сахароза или сорбит в качестве стабилизаторов,
 предпочтительные поверхностно-активные вещества: Kolliphor ELP и Kollidon 12PF (Tween 80 возможно, следует избегать из-за проблем с видимыми частицами).

В гистидиновом буфере, наиболее пригодные условия для стабилизации антител включают:
 низкая ионная концентрация (10-15 мМ),
 рН 5,0-5,1,
 декстроза, сахароза, лизин (моногидрохлорид), инозит, сорбит в качестве стабилизаторов,
 предпочтительные поверхностно-активные вещества: Kolliphor ELP и Kollidon 12PF (Tween 80 возможно, следует избегать из-за проблем с видимыми частицами).

Было обнаружено, что самыми выгодными составами из табл. 6 были DP 2, 4, 7 и 10.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный фармацевтический состав антитела, содержащий
 - (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
 - (ii) глицин в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
 - (iii) моногидрохлорид лизина, декстрозу, сахарозу или сорбит в концентрации от 100 до 320 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
 - (iv) поливинилпирролидон под номером CAS 9003-39-8 (молекулярный вес: 2000-3000 г/моль), касторовое масло полиоксил 35 или полисорбат 80 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл, в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;
 где состав имеет рН от 3,8 до 4,6.
2. Водный фармацевтический состав антитела, содержащий
 - (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
 - (ii) сукцинат в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
 - (iii) моногидрохлорид лизина, декстрозу, сахарозу или сорбит в концентрации от 100 до 320 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
 - (iv) поливинилпирролидон под номером CAS 9003-39-8 (молекулярный вес: 2000-3000 г/моль) или касторовое масло полиоксил 35 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;
 где состав имеет рН от 4,9 до 5,2.
3. Водный фармацевтический состав антитела, содержащий
 - (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
 - (ii) гистидин в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
 - (iii) моногидрохлорид лизина, декстрозу, сахарозу, инозит или сорбит в концентрации от 100 до 320 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
 - (iv) поливинилпирролидон под номером CAS 9003-39-8 (молекулярный вес: 2000-3000 г/моль) или касторовое масло полиоксил 35 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл, в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;
 где состав имеет рН от 4,8 до 5,2.
4. Состав по п. 1, содержащий
 - (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
 - (ii) глицин в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
 - (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации приблизительно 140 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
 - (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;
 где состав имеет рН от 4,2 до 4,6.
5. Состав по п. 1, содержащий
 - (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
 - (ii) глицин в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
 - (iii) ацетат лизина в концентрации приблизительно 140 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
 - (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;

где состав имеет рН от 4,2 до 4,6.

6. Состав по п.3, содержащий

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
- (ii) гистидин в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) сахарозу в концентрации приблизительно 280 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) Kolliphor ELP в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;

где состав имеет рН от 4,8 до 5,2.

7. Состав по п.2, содержащий

- (i) авелумаб в концентрации от 1 до приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;
- (ii) сукцинат в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента, и не содержит никакого другого буферного агента;
- (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации приблизительно 140 мМ в качестве стабилизатора, и не содержит никакого другого стабилизатора;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества, и не содержит никакого другого поверхностно-активного вещества;

где состав имеет рН от 4,8 до 5,2.

8. Состав по п.4, включающий в себя:

- (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) глицин в концентрации 10 мМ;
- (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации 140 мМ;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации 0,5 мг/мл;
- (v) HCl или NaOH для регулирования рН;
- (vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

где состав имеет рН 4,4 ($\pm 0,1$).

9. Состав по п.5, включающий в себя:

- (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) глицин в концентрации 10 мМ;
- (iii) ацетат лизина в концентрации 140 мМ;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации 0,5 мг/мл;
- (v) HCl или NaOH для регулирования рН;
- (vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

причем состав имеет рН 4,4 ($\pm 0,1$).

10. Состав по п.6, включающий в себя:

- (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) гистидин в концентрации 10 мМ;
- (iii) сахарозу в концентрации 280 мМ;
- (iv) Kolliphor ELP в концентрации 0,5 мг/мл;
- (v) HCl или NaOH для регулирования рН;
- (vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

где состав имеет рН 5,0 ($\pm 0,1$).

11. Состав по п.7, включающий в себя:

- (i) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) сукцинат в концентрации 10 мМ;
- (iii) моногидрохлорид лизина в концентрации 140 мМ;
- (iv) касторовое масло полиоксил 35 в концентрации 0,5 мг/мл;
- (v) HCl или NaOH для регулирования рН;
- (vi) воду (для инъекций) в качестве растворителя;

где состав имеет рН 5,0 ($\pm 0,1$).

12. Состав по любому из пп.1-11, где указанный авелумаб имеет последовательность тяжелой цепи или (SEQ ID NO:1), или (SEQ ID NO:2), последовательность легкой цепи (SEQ ID NO:3), и несет гликозилирование на Asp300, который содержит FA2 и FA2G1 в качестве основных гликановых видов, имеющих совместную долю >70% всех видов гликанов.

13. Состав по п.12, где в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет долю 44-54%, а указанный FA2G1 имеет долю 25-41% всех видов гликанов.

14. Состав по п.13, где в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет долю 47-52%, а указанный FA2G1 имеет долю 29-37% всех видов гликанов.

15. Состав по п.14, где в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет долю 49%, а указанный FA2G1 имеет долю 30-35% всех видов гликанов.

16. Состав по любому из пп.12-15, где гликозилирование авелумаба в качестве второстепенного вида гликана содержит А2 с долей <5%, А2G1 с долей <5%, А2G2 с долей <5%, а FA2G2 с долей <7% всех видов гликанов.

17. Состав по п.16, где в гликозилировании авелумаба указанный А2 имеет долю 3-5%, указанный А2G1 имеет долю <4%, указанный А2G2 имеет долю <3%, а указанный FA2G2 имеет долю 5-6% всех видов гликанов.

18. Состав по п.17, где в гликозилировании авелумаба указанный А2 имеет долю 3.5-4.5%, указанный А2G1 имеет долю 0,5-3,5%, указанный А2G2 имеет долю <2,5%, а указанный FA2G2 имеет долю 5,5% всех видов гликанов.

19. Состав по любому из пп.12-18, где указанный авелумаб имеет последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO:2).

20. Состав, который вводится внутривенно по любому из пп.1-19, предназначенный для внутривенного (в.в.) введения.

21. Флакон, содержащий состав по п.20.

22. Флакон по п.21, содержащий 200 мг авелумаба в 10 мл раствора для концентрации 20 мг/мл.

23. Флакон по п.21 или 22, представляющий собой стеклянный флакон.

24. Применение состава по любому из пп.1-20 для лечения рака.

25. Применение по п.24, где рак выбирают из немелкоклеточного рака легких, уротелиальной карциномы, рака мочевого пузыря, мезотелиомы, карциномы из клеток Меркеля, рака желудка или гастроэзофагеального соединения, рака яичников, рака молочной железы, тимомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы почки, плоскоклеточного рака головы и шеи, почечно-клеточной карциномы, меланомы и/или классической лимфомы Ходжкина.

Последовательность тяжелой цепи Авелумаба - SEQ ID NO:1

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG
GITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK
```

Фиг. 1a

Последовательность тяжелой цепи Авелумаба, в которой отсутствует С-концевой К - SEQ ID NO:2

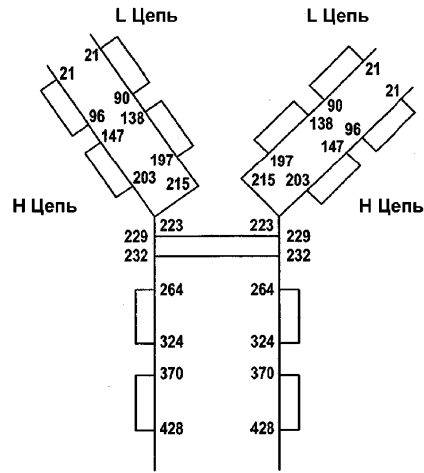
```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG
GITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG
```

Фиг. 1b

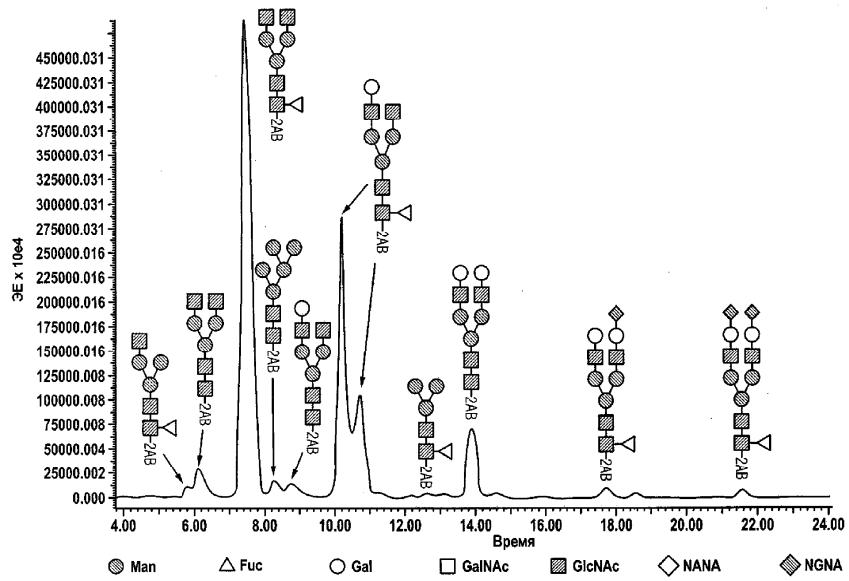
Последовательность легкой цепи Авелумаба -SEQ ID NO:3

```
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINVSWYQQHPGKAPKLMYDVSN
RPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSTRVFGTGKVTVLG
QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK
PSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
```

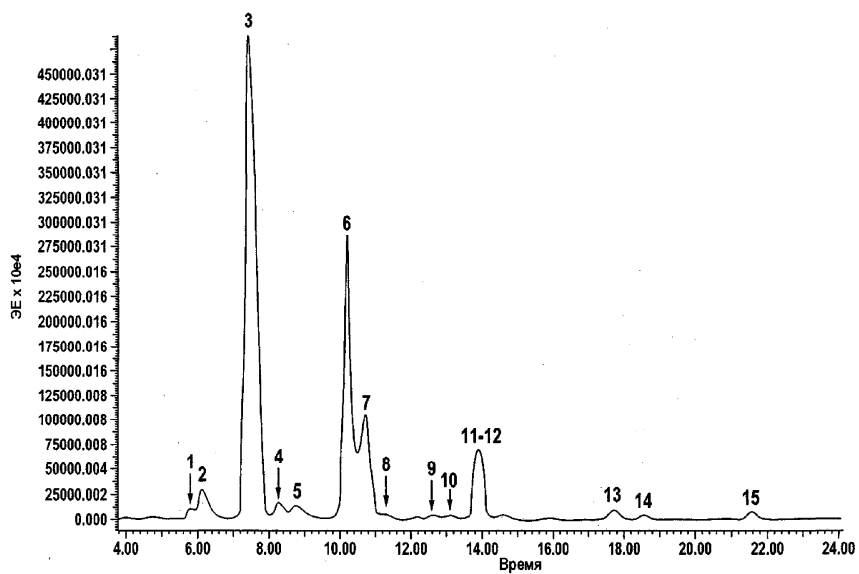
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

